

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 685**

51 Int. Cl.:

A23L 33/105	(2006.01) A61K 36/28	(2006.01)
A23L 29/00	(2006.01) A61K 36/48	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01) A61K 36/52	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01) A61K 36/60	(2006.01)
A61K 35/66	(2015.01) A61K 36/752	(2006.01)
A61K 36/00	(2006.01) A61K 36/889	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01) A61K 36/8962	(2006.01)
A23L 29/30	(2006.01) A61K 36/899	(2006.01)
A23L 33/10	(2006.01)	
A61K 36/23	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2019 PCT/EP2019/064370**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2019 WO19229271**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2019 E 19727047 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2023 EP 3801061**

54 Título: **Microvesículas derivadas de productos de origen vegetal fermentados, método para su preparación y utilización**

30 Prioridad:

01.06.2018 EP 18175575

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2023

73 Titular/es:

**NZYM DEUTSCHLAND GMBH (100.0%)
Georg-Knorr-Str. 1
85662 Hohenbrunn, DE**

72 Inventor/es:

MAY, ALEXANDER

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 954 685 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

Microvesículas derivadas de productos de origen vegetal fermentados, método para su preparación y utilización

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona en general con vesículas extracelulares derivadas del producto de fermentación por microorganismos de materias primas naturales. En particular, la presente invención se relaciona con vesículas extracelulares derivadas de un producto de fermentación de materias primas vegetales, métodos de preparación o enriquecimiento, así como composiciones que contienen vesículas extracelulares de la invención. Además, la presente invención se relaciona con el uso de las vesículas extracelulares y composiciones de la invención en la fabricación de alimentos, suplementos alimenticios y en productos cosméticos o de cuidado personal, así como al uso como fármaco.

10 Antecedentes de la invención

Los alimentos, especialmente aquellos de origen vegetal como frutas y hierbas medicinales, contienen ingredientes que son conocidos por su efecto positivo en la salud general y, por ejemplo, tienen efectos antiinflamatorios o pueden servir como principios activos para el tratamiento o prevención de enfermedades. Sin embargo, debido a rutinas diarias cada vez más estresantes y a la falta de tiempo, cada vez más personas recurren a suplementos dietéticos sintéticos, preparados de vitaminas y minerales, así como productos instantáneos para compensar su estilo de vida poco saludable.

15 La mayoría de los suplementos dietéticos disponibles en farmacias, droguerías y supermercados consisten en vitaminas y minerales y oligoelementos aislados producidos sintéticamente, que a menudo tienen efectos negativos para la salud. Por un lado, las sustancias producidas sintéticamente son menos tolerables que los preparados naturales y, por otro lado, los preparados artificiales suelen contener aditivos y productos químicos nocivos. Así, en los últimos años los productos naturales se han vuelto cada vez más populares como suplementos dietéticos para la promoción de la salud, pero también como alimentos clásicos o en la industria cosmética y existe una demanda creciente de estos. También existe una demanda cada vez mayor de fármacos "naturales", por ejemplo, fármacos elaborados a partir de ingredientes vegetales, para el tratamiento de enfermedades. Por lo tanto, los productos naturales son cada vez más importantes. Los productos naturales son productos tales como materiales, mezclas de sustancias o alimentos o suplementos alimenticios que son en gran parte naturales o elaborados a partir de materias primas de origen natural.

20 Los documentos WO 2012/093755 A1 y KR 2016 0032722 A describen tales productos naturales, en particular vesículas extracelulares de salsa de soja o pasta de soja, así como de bebidas de ácido láctico. Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar otro producto derivado de materias primas naturales que satisfaga las necesidades antes mencionadas. De acuerdo con la invención, esta tarea se soluciona mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y la descripción.

Sumario de la invención

35 La presente invención se relaciona con las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en particular a las microvesículas, *i.e.* vesículas extracelulares del producto de la fermentación por microorganismos de materias primas naturales, en donde las materias primas naturales son materias primas vegetales y comprenden limones, dátiles deshuesados, higos, nueces, cocos, soja, cebollas, brotes de frijol mungo, apio, alcachofas, mijo, y guisantes, y en donde las vesículas extracelulares (EV) son de origen vegetal y microbiano, en donde la fermentación de las materias primas naturales comprende

40 (a) la producción de un primer extracto de fermento o polvo de fermento;
 (b) someter una porción del primer extracto de fermento o polvo de fermento a al menos una fermentación adicional;
 y
 (c) mezclar la porción o porciones de la fermentación o fermentaciones adicionales con la porción restante del extracto de primera fermentación o polvo de fermentación,

45 en donde los microorganismos consisten en *Lactobacillus*, y en donde el tamaño de la EV está entre 150-210 nm, 240-300 nm, 350-410 nm y 575-635 nm, preferiblemente entre 175-185 nm, 265-275 nm, 375-385 nm y 600-610 nm, y en donde el tamaño de la EV se mide mediante análisis de seguimiento de nanopartículas, un método que se describe en el Ejemplo 2 con más detalle. En particular, la presente invención se relaciona con vesículas extracelulares derivadas de dicho producto de fermentación de materias primas naturales que son adecuadas como alimento para humanos, por ejemplo, directamente como fruta y/o en forma fermentada. En particular, la presente invención se relaciona con vesículas extracelulares como las caracterizadas en las reivindicaciones derivadas del producto de fermentación de materias primas vegetales, métodos para su preparación o enriquecimiento y composiciones que contienen vesículas extracelulares de la invención. Además, la presente invención se relaciona con el uso de las vesículas extracelulares y composiciones de la invención tal como se caracterizan en las reivindicaciones en la fabricación de alimentos, suplementos alimenticios y/o en productos cosméticos o de cuidado personal, así como al uso como fármacos.

Los alimentos fermentados tienen un efecto positivo en la salud e incluso pueden prevenir y curar enfermedades, *inter alia* a través de las bacterias probióticas que contienen. Sin embargo, hasta ahora no se sabía que tales productos de fermentación tienen numerosas vesículas extracelulares. Sorprendentemente, esto podría demostrarse en el curso de experimentos sobre la fermentación de materias primas naturales; véase los Ejemplos.

5 Como se demuestra en los Ejemplos, la presente invención *inter alia* se relaciona con EV derivado de un producto de fermentación de materia prima vegetal y microorganismos, caracterizado porque las EV son de origen vegetal y microbiano, en donde las materias primas vegetales comprenden limones, dátiles deshuesados, higos, nueces, cocos, soja, cebollas, brotes de frijol mungo, apio, alcachofas, mijo y guisantes, en donde la fermentación de las materias primas naturales comprende

10 (a) la producción de un primer extracto de fermento o polvo de fermento;
 (b) someter una porción del primer extracto de fermento o polvo de fermento a al menos una fermentación adicional;
 y
 (c) mezclar la porción o porciones de fermentación o fermentaciones adicionales con la porción restante del extracto de primera fermentación o polvo de fermentación,

15 en donde los microorganismos consisten en *Lactobacillus*, y en donde el tamaño de la EV está entre 150-210 nm, 240-300 nm, 350-410 nm y 575-635 nm, preferiblemente entre 175-185 nm, 265-275 nm, 375-385 nm y 600-610 nm, y en donde el tamaño de la EV se mide mediante análisis de seguimiento de nanopartículas, un método que se describe en el Ejemplo 2 con más detalle.

20 En otra realización, las vesículas de acuerdo con la invención proceden de un producto de fermentación, comprendiendo este producto o la materia prima adicionalmente extractos, concentrados, vitaminas, minerales, oligoelementos, sustancias saborizantes y/u otros compuestos orgánicos.

En otra realización, las vesículas de la invención se originan a partir de un producto de fermentación, en donde la materia prima y/o el producto de fermentación está libre o sustancialmente libre de agentes colorantes, conservantes,
 25 alcohol, azúcar, gluten y leche.

El tamaño de las vesículas de la invención está entre 150 y 210 nm, entre 240 y 300 nm, entre 350 y 410 nm y entre 575 y 635 nm. Más preferentemente, el tamaño de las vesículas de la invención está entre 160 y 200 nm, entre 250 y 290 nm, entre 360 y 400 nm y entre 585 y 625 nm. Aún más preferentemente, el tamaño de las vesículas de la invención está entre 170 y 190 nm, entre 260 y 280 nm, entre 370 y 390 nm y entre 595 y 615 nm. Lo más
 30 preferiblemente, el tamaño de las vesículas de la invención está entre 175 y 185 nm, entre 265 nm y 275 nm, entre 375 y 385 nm y entre 600 y 610 nm.

Además, las vesículas de la invención comprenden un ingrediente activo de interés, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en un ingrediente activo fitoquímico, moléculas de ácido nucleico tales como ARNnc, ARNr, ARNm, ARNm_i, ARNt, ADNds y/o ADNs, proteínas, en enzimas, lípidos y receptores de membrana particulares.

35 Otra realización de la presente invención se relaciona con un método para la preparación o enriquecimiento de las vesículas de la invención, en donde el método comprende la fermentación de las materias primas en presencia de los microorganismos aquí descritos y la recuperación o enriquecimiento de las vesículas de la invención del producto de la fermentación. Como se describió anteriormente, la fermentación de las materias primas comprende la producción de un primer extracto de fermento o polvo de fermento, sometiendo una porción del primer extracto de fermento o
 40 polvo de fermento a al menos una fermentación adicional, y mezclando esa porción con la porción restante del primer extracto de fermento o polvo de fermento. Este método de fermentación también se conoce como fermentación en cascada como se describe en las patentes europeas EP 1 153 549 B1 y EP 2 560 506 B1.

En otra realización del método de la invención, la materia prima vegetal que contiene el ingrediente activo de interés se fermenta o el ingrediente activo se agrega a la materia prima y/o al producto de fermentación.

45 De acuerdo con la invención, la fermentación descrita se lleva a cabo mediante *Lactobacillus*.

En una realización de la presente invención, el enriquecimiento o aislamiento de las vesículas de la invención se lleva a cabo mediante ultracentrifugación y centrifugación por gradiente de densidad, respectivamente, electroforesis, cromatografía, método de columna, precipitación, liofilización, secado y/o nanofiltración.

50 Otra realización de la presente invención se relaciona con una composición que contiene las vesículas de la invención, en donde su concentración es preferiblemente superior a 1×10^8 /ml, particularmente de manera preferible mayor que 1×10^9 /ml y particularmente de manera preferible mayor que 1×10^{10} /ml.

La composición de la invención se presenta preferentemente en forma líquida, en polvo o liofilizada y es un producto natural, alimento para fines médicos especiales (dietas equilibradas), alimento dietético, suplemento alimenticio, cosmético o producto de cuidado corporal, en particular una loción. La composición de la invención también puede
 55 comprender un portador y/o estabilizador farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

La presente invención también se relaciona con el uso de las vesículas o de la composición de la invención en la elaboración de alimentos para fines médicos especiales (dietas equilibradas), alimentos dietéticos, suplementos alimenticios y/o en productos cosméticos o de cuidado personal. Además, la presente invención se relaciona con las vesículas o la composición de la invención para uso como fármaco.

5 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: medición NanoSight™ del tamaño de vesículas extracelulares aisladas de un producto de fermentación de materias primas vegetales. El aislamiento se realizó con el método ExoQuick™ y se utilizó el software "Nanoparticle Tracking Analysis" (NTA). Los resultados de un experimento representativo se muestran aquí. Se aislaron vesículas extracelulares de cuatro tamaños diferentes, con tamaños de 181 nm, 271 nm, 378 nm y 604 nm.

10 Figura 2: medición NanoSight™ del tamaño de vesículas extracelulares aisladas de jugo de limón exprimido (A), *Lactobacillus paracasei* (con fructosa) fermentado (B) y limones fermentados *Lactobacillus paracasei* (fermentación única de 7 días bajo condiciones de laboratorio) (C).

15 Figura 3: Análisis de la rata de consumo de oxígeno no mitocondrial (OCR) de PBMC tratadas con diferentes concentraciones de las vesículas extracelulares de la invención. La proporción de respiración no mitocondrial sobre la respiración total de las células no tratadas (sin) se establece en 100 %. Los datos indicaron que el tratamiento de las células con vesículas extracelulares reduce la respiración no mitocondrial.

Definiciones

20 Inicialmente, algunos de los términos utilizados en esta solicitud se explicarán a continuación con más detalle: Las "sustancias bioactivas" o "sustancias biológicamente activas" son sustancias contenidas en los alimentos que no tienen carácter nutritivo, pero tienen un efecto promotor de la salud. Estos son principalmente fitoquímicos secundarios, pero también fibras dietéticas y sustancias en alimentos fermentados.

25 Las vesículas extracelulares son vesículas de membrana a nanoescala que son secretadas por la mayoría de los tipos de células *in vivo* e *in vitro* al medio ambiente y puede ser reabsorbido por un gran número de células. En el sentido de la presente invención, el término "vesículas extracelulares", como se usa aquí, incluye exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos, así como nanopartículas y nanovesículas tipo vesículas o exosomas. Los exosomas suelen tener un diámetro de solo 50 nm a 150 nm, seguidos de microvesículas de 100 nm a 1000 nm. Aún más grandes son los cuerpos apoptóticos con diámetros que van desde 500 nm a 4000 nm, que se liberan durante la muerte celular programada por la constricción de partes de células enteras. Las vesículas extracelulares también incluyen exosomas, epididimosomas, argosomas, vesículas tipo exosomas, micropartículas, promininosomas, prostasomas, dexosomas, 30 texosomas y oncosomas.

35 Las microvesículas se forman por protrusión de la membrana celular externa, los exosomas por invaginación de los llamados endosomas, que pertenecen al sistema de membrana endosomal dentro de la célula, como lisosomas (digestión intracelular) o el retículo endoplásmico (biosíntesis de membrana). Estos endosomas pueden formar "vesículas en vesículas" a través de invaginaciones de membrana. Esto da como resultado cuerpos multivesiculares (MVB) que se fusionan con la membrana celular externa y liberan su contenido como exosomas en el espacio extracelular. Las vesículas contienen diversas biomoléculas de su célula de origen, incluidos ácidos nucleicos (ARNm, ARNm), proteínas, lípidos, polisacáridos u otras sustancias bioactivas de composición variable, y sirven como vehículos de transporte y para la secreción de componentes celulares. Los cuerpos apoptóticos también pueden 40 contener ADN, histonas y orgánulos.

45 "Fermentación" o "fermentar" de acuerdo con la presente invención significa la conversión microbiana o enzimática de materia orgánica en ácido, gas o alcohol. La fermentación se utiliza deliberadamente en biotecnología. Esto se hace ya sea agregando cultivos celulares bacterianos, fúngicos u otros biológicos o agregando enzimas (fermentos), que llevan a cabo la fermentación dentro del marco de su metabolismo catalizado por enzimas. Algunos de estos microorganismos ya están presentes de forma natural en los materiales de partida, por ejemplo, durante fermentación espontánea.

A menos que se defina o utilice específicamente de otro modo, el término "producto de fermentación" significa cualquier producto o producto intermedio resultante de la conversión de materiales biológicos, en particular materias primas naturales con la ayuda de cultivos bacterianos, fúngicos o celulares, en forma líquida o sólida, y que contiene el mismo.

50 Los "productos naturales" se refieren a productos tales como materiales, mezclas de sustancias o productos alimenticios o suplementos alimenticios que son en gran parte naturales o elaborados a partir de materias primas de origen natural.

55 Como se usa aquí, el término "ingrediente activo fitoquímico" se refiere a un compuesto de origen vegetal no nutritivo. Las sustancias fitoquímicas también se conocen como fitonutrientes o fitoquímicos secundarios que componen el sistema inmunológico de la planta. Ejemplos de ingredientes fitoquímicos incluyen monofenoles, flavonoides como flavonoles, flavanonas, flavonas, flavan-3-oles, antocianinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonoles, calconas y cumestanos, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, lignanos, ésteres de tirosol, estilbenoides, taninos

hidrolizables, carotenoides como carotenos y xantofilas, monoterpenos, saponinas, lípidos como fitoesteroles, tocoferoles y ácidos grasos omega-3,6,9, diterpenos, triterpinoides, betalainas como betacianinas y betaxantinas, ditioltonas, tiosulfonatos, indoles y glucosinolatos. Sin embargo, esos ejemplos no deben considerarse como limitantes.

5 Descripción detallada de la invención

En el transcurso de experimentos sobre la fermentación de materias primas naturales, se demostró sorprendentemente que en un producto de fermentación elaborado a partir de materias primas vegetales están presentes vesículas extracelulares. Como se describe a continuación y se ilustra en los Ejemplos, las vesículas de la invención se detectaron y aislaron sorprendentemente de un determinado lote de productos Regulat de Dr. Niedermaier Pharma GmbH, una serie de múltiples suplementos alimenticios fermentados, en donde REGULATESSENZ® es el ingrediente básico de estos productos; véase también el Ejemplo 1. Aunque el principio de fabricación de los productos Regulat, por ejemplo, fermentación en cascada, se describe en términos generales en las dos patentes europeas EP 1 153 549 B1 y EP 2 560 506 B1 junto con partes de los ingredientes, la presente invención permite ahora por primera vez llevar a cabo un control de calidad para que los productos Regulat y productos equivalentes con base en la fermentación de materias primas naturales beneficiosas para la salud puedan fabricarse con una calidad constante controlando y monitorizando la cantidad y calidad de las vesículas extracelulares como se ha descrito anteriormente e ilustrado en los Ejemplos. Además, las vesículas disponibles a partir de tales productos de fermentación se pueden usar ventajosamente en productos que promueven la salud y el bienestar general como se describe a continuación.

Las vesículas extracelulares son vesículas de membrana a nanoescala que son secretadas por la mayoría de los tipos de células *in vivo* e *in vitro* en el medio ambiente. Las vesículas contienen diversas biomoléculas de su célula de origen, incluidos ácidos nucleicos como ARNm, ARNm_i o ARNs_i, proteínas, lípidos, polisacáridos y otros ingredientes bioactivos de composición variable, y sirven como vehículos de transporte y para la secreción de componentes celulares.

Por ejemplo, dichas vesículas se liberan desde la superficie de muchos tipos diferentes de células humanas en diversos fluidos corporales como plasma, leche, saliva, sudor, lágrimas, esperma y orina. En la industria farmacéutica, las vesículas extracelulares se utilizan en la actualidad principalmente como vesículas con contenidos cargados artificialmente, por ejemplo, para transportar ingredientes farmacéuticos activos en el cuerpo humano a su destino o para aumentar la biodisponibilidad de sustancias.

Por el contrario, las vesículas de la invención tienen ingredientes naturales o principios activos promotores de la salud y pueden obtenerse a partir de un producto de fermentación de materias primas vegetales y utilizarse como suplemento alimenticio o añadirse a alimentos, suplementos alimenticios, cosméticos o productos de cuidado corporal y también formulado como un fármaco.

Las vesículas de la invención ofrecen así una solución a la necesidad en constante crecimiento de compuestos naturales para la promoción de la salud en general así como para la prevención y tratamiento de enfermedades. En consecuencia, el aislamiento de estas vesículas a partir de materias primas naturales, en particular de materias primas vegetales, tiene un gran potencial para diversas industrias, en particular para la industria alimentaria y de la salud.

En cuanto al aspecto de materias primas renovables y de protección del medio ambiente así como el ya conocido efecto positivo del producto de la fermentación, que sirvió de base para el aislamiento de las vesículas de la invención en el Ejemplo realizado de acuerdo con la presente invención, y las propiedades asociadas de las vesículas que se originan a partir de este producto, la presente invención se refiere a vesículas extracelulares, que se pueden obtener a partir de un producto de fermentación de materias primas vegetales como se caracteriza en las reivindicaciones.

Así, la presente invención proporciona vesículas extracelulares (EV) derivadas de un producto de fermentación de materia prima vegetal como se caracteriza en las reivindicaciones. De acuerdo con la presente invención, las vesículas extracelulares, también denominadas vesículas de membrana o vesículas de membrana externa en el caso de bacterias Gram negativas, incluyen exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos así como nanopartículas y nanovesículas tipo vesículas o exosomas. Como ya se describió anteriormente, los diferentes tipos de vesículas difieren *inter alia* en su tamaño, lo que permite a un experto distinguirlos, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

Además, la publicación de Müller, J Bioanal Biomed 4 (2012), 4 resume una serie de métodos para la validación del enriquecimiento de vesículas extracelulares a partir de una población celular. Estos incluyen varios parámetros como tamaño y densidad para diferenciar entre exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, así como para distinguir entidades contaminantes, lípidos (gotitas), lipoproteínas, agregados de proteínas, micelas de proteína-fosfolípido, células y fragmentos de membrana.

Se proporciona, por ejemplo, en Li et al., Theranostics 7 (2017), 789-804, un resumen del uso de las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de vesículas extracelulares y técnicas para su aislamiento. Además, una consolidación de la técnica anterior para el aislamiento de vesículas extracelulares, incluidos los exosomas, incluida la indicación de las propiedades de los métodos individuales, incluido el tamaño de las vesículas aisladas según el método, eficiencia

del aislamiento, rendimiento de vesículas, propiedades de vesículas extracelulares aisladas y la carga de trabajo es proporcionada por Konoshenko et al., en BioMed Research International 2018, artículo ID 8545347, 27 páginas; <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>. Como se muestra por ejemplo en la Tabla 3 de Konoshenko *et al.*, la selección del método para aislar las vesículas extracelulares permite una preselección de su tamaño. Para obtener vesículas extracelulares > 200 nm y en particular > 300 nm preferiblemente, se utilizan los sistemas ExoQuick™ (System Biosciences, EE.UU.), véanse también los Ejemplos, y PROSPR (PROtein Organic Solvent PREcipitation), este último en particular con fines analíticos.

La capacidad de formar vesículas extracelulares se conoce desde hace mucho tiempo por diversos microorganismos (Lee et al., Proteomics 9 (2009), 5425-5436) y esta propiedad también ha sido descrita para células vegetales, ver por ejemplo Ju et al., Mol. Ther. 21 (2013), 1345-1357. En principio, por lo tanto, sería posible que las vesículas de la invención en el producto de fermentación sean secretadas solo por células de la materia prima vegetal o solo por los microorganismos presentes, en cuyo último caso se puede suponer que las vesículas absorben compuestos procedentes de células vegetales y formadas durante la fermentación, respectivamente. Sin pretender estar ligado a una teoría determinada, se supone en el presente caso que las vesículas de la invención proceden tanto de la materia prima vegetal, *i.e.* tanto de las células vegetales como de las células de los microorganismos. Como se describió anteriormente, los diferentes tipos de vesículas difieren *inter alia* en su tamaño, sino también en su génesis celular característica, y por lo tanto pueden tener diferentes composiciones de proteínas y ácidos nucleicos debido a su diferente formación. En particular, también existen diferencias en la composición de lípidos entre vesículas extracelulares derivadas de células animales, vegetales o bacterianas. Los métodos para el análisis de las composiciones de las vesículas se describen en detalle en Müller, J. Bioanal. Biomed 4 (2012), 4 e *inter alia* un método para determinar la composición de lípidos también se describe en Ju et al., Mol Ther 21 (2013), 1345-1357. En consecuencia, en la invención, las vesículas se caracterizan por la presencia de vesículas y/o componentes de membrana de origen microbiano y vegetal.

Los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención confirmaron que las vesículas extracelulares aisladas de materia prima vegetal antes de la fermentación (A) y de bacterias fermentadas con fructosa pero sin otros ingredientes (B), así como del producto crudo vegetal de fermentación con bacterias (C) cada uno muestra una distribución de tamaño única con las vesículas extracelulares del producto de fermentación de la materia prima (C) que no solo muestran un mero aditivo sino además o alternativamente una distribución de tamaño intermedia; véase el Ejemplo 3 y la Figura 2. Estos datos muestran que las vesículas extracelulares derivadas del producto de fermentación de materias primas vegetales fermentadas por microorganismos tales como bacterias son de origen microbiano y vegetal. En consecuencia, las vesículas extracelulares (EV) derivadas de un producto de fermentación de materias primas naturales tales como materias primas vegetales se distinguen claramente de las EV derivadas de material vegetal y los microorganismos utilizados para la fermentación, así como de la simple mezcla de estas. Los análisis correspondientes se pueden realizar preferiblemente de acuerdo con los ejemplos adjuntos y los métodos descritos en ellos.

En consecuencia, en una realización de la presente invención, las vesículas extracelulares derivadas del producto de fermentación de la materia prima vegetal son diferentes, por ejemplo, en su tamaño, de las vesículas extracelulares que se obtienen de la materia prima vegetal antes de la fermentación y de las bacterias utilizadas para el proceso de fermentación.

La presente invención se relaciona con vesículas extracelulares que se derivan de un producto de fermentación de materias primas vegetales que comprenden limones, dátiles deshuesados, higos, nueces, cocos, soja, cebollas, brotes de frijol mungo, apio, alcachofas, mijo y guisantes y en las que la fermentación comprende

(a) la producción de un primer extracto de fermento o polvo de fermento;
 (b) someter una porción del primer extracto de fermento o polvo de fermento a al menos una fermentación adicional;
 y
 (c) mezclar la porción o porciones de la fermentación o fermentaciones adicionales con la porción restante del extracto de primera fermentación o polvo de fermentación,

en donde los microorganismos consisten en bacterias del ácido láctico, específicamente, *Lactobacillus*, y en donde el tamaño de la EV está entre 150-210 nm, 240-300 nm, 350-410 nm y 575-635 nm, preferiblemente entre 175-185 nm, 265-275 nm, 375-385 nm y 600-610 nm.

Preferentemente, los microorganismos que llevan a cabo la fermentación se seleccionan del grupo formado por: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* (incluyendo *Shirota*), *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus farraginis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus parafarraginis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sporogenes*, *Lactobacillus zeeae*, y/o mezclas de estos, en donde los microorganismos ya están presentes en/sobre las materias primas vegetales (fermentación espontánea) o se añaden externamente a las materias primas.

En una realización de la presente invención, la fermentación la lleva a cabo sólo una de las especies de microorganismos antes mencionadas. En otra realización de la presente invención, la fermentación se lleva a cabo mediante una combinación de una o más de las especies de microorganismos antes mencionadas, en donde los microorganismos llevan a cabo la fermentación juntos o se agregan sucesivamente a la materia prima en diferentes etapas de fermentación.

De acuerdo con la presente invención, la fermentación es realizada por microorganismos del género *Lactobacillus*. En una realización preferida, la fermentación se lleva a cabo bien sea solo por microorganismos de la especie *Lactobacillus paracasei* o por *Lactobacillus paracasei* en combinación con *Lactobacillus rhamnosus*, en donde *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* se añaden preferentemente a la materia prima vegetal en diferentes etapas de fermentación.

Además de los productos alimenticios frescos y recién almacenados preferidos según se caracterizan en las reivindicaciones, los alimentos procesados adicionalmente y los productos alimenticios de lujo, así como sus desechos como fuentes de materia prima para la fermentación y el producto de fermentación, se consideran materias primas naturales y materias primas, de las cuales las vesículas de la invención, como en particular los procedentes de la preparación de productos alimenticios tales como celulosa y fibras naturales, bagazo, orujo, cascarilla de avena, pulpa de remolacha, cascarilla de cacao, patata cocida, arroz cocido, residuos de patata, melaza, granos de cacao, cáscaras de frutas y verduras, huesos de frutas, granos usados de malta y otros desechos vegetales que se utilizan como materias primas permitidas para la producción de compostaje de calidad. En consecuencia, la presente invención también contribuye a la utilización de residuos de la producción de alimentos, productos alimenticios de lujo y pienso para animales.

Por supuesto, se pueden añadir sustancias adicionales a la materia prima, como diversos extractos de plantas, concentrados de plantas, vitaminas, minerales, oligoelementos, sustancias saborizantes y/u otros compuestos orgánicos. Por lo tanto, la materia prima y el producto de fermentación, respectivamente, en una realización adicional comprenden extractos, concentrados, vitaminas, minerales, oligoelementos, sustancias saborizantes y/u otros compuestos orgánicos adicionales. Además o alternativamente, la materia prima y el producto de fermentación, respectivamente, están libres o sustancialmente libres de agentes colorantes, conservantes, alcohol, azúcar, en particular lactosa, gluten y leche. En particular para alcohol, "sustancialmente libre" significa que menos del 2 %, preferiblemente menos del 1.5 %, más preferiblemente menos del 1.2 % y lo más preferiblemente menos del 0.9 % de alcohol está presente en la materia prima y el producto de fermentación, respectivamente. Con respecto a la lactosa, "sustancialmente libre" significa que menos del 1 %, preferiblemente menos del 0.5 % y más preferiblemente entre 0.1 % y 0.3 % de lactosa está presente en la materia prima y el producto de fermentación, respectivamente.

Se encontraron vesículas extracelulares de diferentes tamaños en el producto de fermentación de materias primas vegetales. La purificación y cuantificación, incluida la determinación del tamaño de las vesículas de la invención a partir del producto de fermentación de materias primas vegetales a pequeña escala, se llevó a cabo como se describe en los Ejemplos. Se encontraron vesículas con un tamaño entre 30 nm y 1000 nm. En particular, como se muestra en el Ejemplo 2, usando la tecnología ExoQuick se encontraron vesículas de cuatro tamaños diferentes, i.e. se encontraron vesículas de aproximadamente 181 nm, aproximadamente 271 nm, aproximadamente 378 nm y aproximadamente 604 nm en una medición representativa.

Las vesículas de la invención tienen un tamaño de

(i) entre 150 nm y 210 nm, preferiblemente entre 160 nm y 200 nm, más preferiblemente entre 170 nm y 190 nm, aún más preferiblemente entre 175 nm y 185 nm y lo más preferiblemente tienen un tamaño de 181 nm;
 (ii) entre 240 nm y 300 nm, preferiblemente entre 250 nm y 290 nm, más preferiblemente entre 260 nm y 280 nm, aún más preferiblemente entre 265 nm y 275 nm y lo más preferiblemente tienen un tamaño de 271 nm;
 (iii) entre 350 nm y 410 nm, preferiblemente entre 360 nm y 400 nm, más preferiblemente entre 370 nm y 390 nm, aún más preferiblemente entre 375 nm y 385 nm y lo más preferiblemente tienen un tamaño de 378 nm; y
 (iv) entre 575 nm y 635 nm, preferiblemente entre 585 nm y 625 nm, más preferiblemente entre 595 nm y 615 nm, aún más preferiblemente entre 600 nm y 610 nm y lo más preferiblemente tienen un tamaño de 604 nm.

En la presente invención, el producto de fermentación de materias primas vegetales comprende vesículas de la invención en los cuatro tamaños de (i) - (iv) descritos.

En consecuencia, la presente invención también proporciona composiciones que contienen las vesículas de la invención en la combinación de tamaños mencionada anteriormente.

En una realización preferida, las vesículas de la invención del tamaño de (i) a (iv) están presentes en la siguiente distribución:

(i) 30-40 %, preferiblemente aproximadamente 35±2 %;
 (ii) 25-35 %, preferiblemente aproximadamente 29±2 %;
 (iii) 25-35 %; preferiblemente aproximadamente 30±2 %; y
 (iv) 2.5-10 %, preferiblemente aproximadamente 6±2 %; ver también los Ejemplos.

Las vesículas extracelulares suelen contener *inter alia* proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y receptores de membrana. Estos pueden ser detectados mediante procedimientos estandarizados conocidos por la persona experimentada en la técnica. Los experimentos mostraron que los ácidos nucleicos se pueden aislar de las vesículas de la invención. En particular, a partir de 10 ml del producto de fermentación de materias primas vegetales, fue posible aislar 1.2 µg de ADN y 13 µg de ARN; ver Ejemplo 5. Por consiguiente, en una realización se pueden aislar más de 0.1 µg de ADN y/o más de 1 µg de ARN de las vesículas aisladas de 1 ml del producto de fermentación.

El análisis de los componentes de las vesículas extracelulares suele ir precedido de una etapa de su aislamiento. Los métodos para el aislamiento de exosomas se resumen, por ejemplo, en la disertación "Isolierung und Charakterisierung funktioneller Exosomen durch sequentielle Filtration" por Heinemann 2016, en donde un método prometedor con respecto al aislamiento de exosomas es un método desarrollado por Lamparski *et al.* (Lamparski *et al.*, Journal of Immunological Methods 270 (2002), 211-226). Este método se basa en una combinación de filtración tangencial (TFF) y ultracentrifugación posterior sobre un gradiente de deuterio sacarosa. Este método representa un avance significativo sobre otros métodos, ya que permite aislar exosomas de grado clínico por primera vez. Estas preparaciones de exosomas particularmente puras ya se utilizan en estudios clínicos en pacientes, por ejemplo, para la inmunoterapia experimental de pacientes con cáncer (Escudier *et al.*, Journal of Translational Medicine 3 (2005), 10 y Morse *et al.*, Journal of Translational Medicine 3 (2005), 9).

En general, las proteínas pueden detectarse mediante electroforesis, espectrometría de masas, citometría de flujo y proteómica. Los ácidos nucleicos se pueden detectar mediante PCR, análisis de micromatrices, secuenciación profunda y secuenciación de última generación. Los lípidos se pueden detectar mediante cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas o HPLC. Dichos métodos de detección se enumeran, entre otros, en Zaborowski *et al.*, BioScience 65 (2015), 783-797. Un método general para el aislamiento y métodos adicionales para la caracterización de exosomas y microvesículas se describen con más detalle en Müller, J Bioanal Biomed 4 (2012), 4.

Así, la presente invención proporciona vesículas extracelulares de acuerdo con las reivindicaciones que comprenden un principio activo de interés, en donde dicho principio activo se selecciona preferentemente del grupo formado por proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y receptores de membrana de la célula de origen.

En este contexto, las vesículas de la invención de acuerdo con las reivindicaciones contienen preferentemente ingredientes biológicamente activos e ingrediente activo, respectivamente, que tienen un efecto sobre las células animales y humanas y sobre el organismo animal y humano, respectivamente, en general. En el ejemplo 4 se describe un método para detectar la actividad biológica de las vesículas de la invención. En este contexto, se ha demostrado en el Ejemplo 4 que las vesículas extracelulares de la presente invención exhiben ventajosamente un efecto positivo sobre el consumo de oxígeno no mitocondrial que representa un componente del índice de salud bioenergética (BHI); véase la figura 3. Por este motivo se puede concluir que las vesículas de la invención tienen un efecto positivo sobre el BHI el cual es considerado como un biomarcador para evaluar la salud del paciente con valor tanto pronóstico como diagnóstico (Chacko *et al.*, Clin. Sci. 127 (2014), 367-373).

Las proteínas se pueden seleccionar del grupo que consiste en proteínas de choque térmico/chaperonas, proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), proteínas del complejo de clasificación endosomal requeridas para el transporte (ESCRT), metaloproteinasas de matriz (MMP), así como enzimas como fosfolipasas, grasas sintasas ácidas, integrininas, glicoproteínas y fosfoproteínas y selectinas. Los lípidos pueden seleccionarse del grupo que consiste en gangliósidos, esfingomiélinas y grasas insaturadas. Los ácidos nucleicos se pueden seleccionar del grupo que consiste en ARNnc, ARNr, ARNm, ARNmi, ARNt y ADNds, ADNs. Los receptores de membrana incluyen, por ejemplo, las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Cabe señalar que las listas anteriores no están completas y no pretenden limitar la presente invención.

Además, se puede suponer, sin embargo, sin estar ligado a una teoría determinada, que las vesículas de la invención de acuerdo con las reivindicaciones también incluyen otros ingredientes biológicamente activos, especialmente metabolitos vegetales secundarios. Esto puede justificarse por el hecho de que, como se ha descrito anteriormente, las vesículas extracelulares también pueden tener su origen en células eucariotas, en este caso vegetales, que comprenden los metabolitos secundarios mencionados.

Estos metabolitos vegetales secundarios incluyen, pero no se limitan a, *inter alia* compuestos fenólicos tales como fenoles simples, polifenoles que incluyen flavonoides tales como flavonoides tales como flavonoles, flavanonas, flavonas, flavan-3-oles, antocianinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonoles, calconas y cumestanos, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, lignanos, ésteres de tirosol, estilbenoides, taninos hidrolizables, carotenoides tales como carotenos y xantofilas, monoterpenos, saponinas, xantonas, fenilpropanoides, estilbenos y sus glucósidos, compuestos isoprenoides incluyendo terpenos, esteroides y sus glucósidos, betalainas tales como betacianinas y betaxantinas, carotenoides tales como carotenos y xantofilas, lípidos de almacenamiento, alcaloides como cafeína y nicotina, aminoácidos como aliina o canavanina, lípidos como fitoesteroles, tocoferoles y ácidos grasos omega-3,6,9. Dichos metabolitos vegetales secundarios se pueden detectar mediante análisis estandarizados de HPLC y GC con y sin espectrometría de masas acoplada.

Sin embargo, sin estar ligado a ninguna teoría en particular, puede esperarse razonablemente que las vesículas extracelulares de la invención contengan ingredientes activos que tengan un efecto positivo sobre la salud después de la ingestión en un sujeto humano o animal.

5 Inicialmente, se sabe que los exosomas pueden fusionarse con la membrana citoplasmática de una célula diana. Esta fusión convierte las proteínas exosomales en nuevos componentes de la superficie celular. Por ejemplo, los receptores se pueden transferir intercelularmente. Una consecuencia de esto es que las células así moduladas pueden ser activadas por nuevos ligandos bioactivos. A través de la fusión con la célula, los ácidos nucleicos contenidos en el exosoma (por ejemplo, ARNm, ARNmi) también pasan a formar parte del citoplasma de la célula. Posteriormente, el genoma de la célula puede modularse epigenéticamente como resultado de esta transferencia (Valadi et al., Nat Cell Biol 9 (2007), 654-659). Esto se puede hacer, por ejemplo, silenciando o mejorando ciertos segmentos de genes con ARNmi exosómicos. Además, los ARNm transportados exosomalmente se pueden traducir directamente desde la célula diana (Deregibus et al., Blood 110 (2007), 2440-2448). Los exosomas también pueden causar efectos en las células diana sin fusión con la membrana celular. La activación de los receptores de la membrana celular en la célula diana puede conducir a la activación de cascadas de señalización intracelular con consecuencias específicas dependiendo de la cascada de señalización.

También se sabe a partir de la literatura que las vesículas extracelulares tienen varias propiedades de un sistema de administración de fármacos eficiente, de modo que los ingredientes activos potenciales pueden absorberse más rápidamente. *i.e.* aumenta la biodisponibilidad de los principios activos encapsulados en vesículas extracelulares. Por ejemplo, a pesar de las numerosas propiedades bioactivas y terapéuticas, la curcumina solo tiene un beneficio farmacéutico limitado debido a su baja solubilidad y estabilidad en agua y su baja biodisponibilidad sistémica. Mediante la encapsulación en exosomas de leche, se pudo aumentar la estabilidad de la curcumina en PBS, sobrevivió a procesos de digestión difíciles y atravesó la barrera intestinal como curcumina libre. La encapsulación de la curcumina en los exosomas aumentó así su estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad (Vashisht et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 183 (2017), 993-1007).

25 En consecuencia, es razonable esperar que los ingredientes activos encapsulados en vesículas extracelulares de la invención, *i.e.* los derivados de un producto de fermentación de materias primas vegetales de acuerdo con las reivindicaciones, también exhiben una mayor biodisponibilidad, estabilidad y solubilidad y, por lo tanto, pueden ponerse a disposición del organismo humano o animal.

30 Como ya se describió anteriormente, se puede esperar que las vesículas de la invención en el producto de fermentación de materias primas vegetales se originen a partir de células de microorganismos y células vegetales.

En el caso de las vesículas derivadas de bacterias, ya se ha demostrado que tienen un efecto positivo en la salud humana. Por ejemplo, la vitamina K2 (menaquinona) es producida únicamente por bacterias, incluidas *Bacillus subtilis*, ciertas bacterias del ácido láctico y propionibacterias, y actúa en el cuerpo humano como un cofactor de carboxilasa para la maduración de proteínas, que está involucrada en muchos procesos fisiológicos esenciales (Liu et al., 49 (2018), 179-184). Además, se demostró que las vesículas extracelulares producidas por bacterias asociadas al microbioma pueden atravesar la barrera epitelial de la mucosa humana e interactuar con las células inmunitarias (Zhang et al., PLoS One 8 (2013), e77966).

40 En cuanto a las vesículas extracelulares de las células vegetales, por ejemplo, Ju et al. Mol. Ther. 21 (2013), 1345-1357 han demostrado que se podían aislar vesículas tipo exosomas de uvas y que estas vesículas desencadenaban la proliferación de células madre intestinales después de la administración oral y mostraban efectos terapéuticos en un modelo experimental de colitis en ratones. Mu et al. (2014) han demostrado que las nanopartículas tipo exosomas son absorbidas por el intestino e inducen la expresión de genes cruciales para el mantenimiento de homeostasis intestinal (citocinas antiinflamatorias, antioxidantes, etc.) (Mu et al., Mol. Nutr. Food Res. 58 (2014), 1561).

45 Además, los fitoquímicos como sustancias vegetales bioactivas, que se supone que también están presentes en las vesículas extracelulares, han atraído mucha atención como ingredientes preventivos y terapéuticos contra el cáncer al demostrar que los fitoquímicos regulan la expresión de microARN (ARNmi/Rmi), que están funcionalmente involucrados en patobiología del cáncer. En el libro se ofrece una descripción general "Mitochondria as Targets for Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy", Chandra, Dhyan (ed.) (2013), 187-206.

50 En numerosas publicaciones se describen otros efectos de los metabolitos secundarios de las plantas. Por ejemplo, saponinas, que se encuentran principalmente en legumbres, avena y algunas especies vegetales, y flavonoides, que están presentes en casi todas las plantas, tienen efectos antiinflamatorios (Watzl y Leitzmann: Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. 3ra, edición sin cambios). Hippokrates, Stuttgart 2005, ISBN 3-8304-5308-6; Watzl y Rechkemmer: Basiswissen aktualisiert: Flavonoide. En: Ernährungs-Umschau. 48, Número 12, 2001. Los carotenoides, como alfacaroteno, betacaroteno y betacriptoxantina, que dan el color anaranjado y amarillo a las frutas y verduras, se convierten en el cuerpo en vitamina A, que es importante para un sistema inmunitario sano, así como para una piel y membranas mucosas sanas. La fitina de cereales tiene su efecto en la regulación del nivel de azúcar en sangre.

Así, en una realización de la invención, tales materiales vegetales que contienen el ingrediente activo de interés pueden añadirse cada vez más a la materia prima vegetal de acuerdo con las reivindicaciones para producir

composiciones con el correspondiente efecto de interés. Es particularmente interesante que las vesículas de la invención se originen a partir de un producto de fermentación de acuerdo con la reivindicación 1 de materia prima vegetal, en donde las materias primas comprenden limones, dátiles deshuesados, higos, nueces, cocos, soja, cebollas, brotes de frijol mungo, apio, alcachofas, mijo y guisantes.

- 5 Por ejemplo, se pueden añadir más frutas y verduras anaranjadas y amarillas al material vegetal para acumular carotenoides en las vesículas de la invención y, en consecuencia, proporcionar composiciones que tengan un efecto positivo sobre el sistema inmunológico. Dichos enfoques son concebibles en una amplia variedad de combinaciones y están cubiertos por esta invención.

- 10 Por tanto, las vesículas de la invención o la composición de la invención se proporcionan para uso como fármacos. De acuerdo con la presente invención, la fermentación de las materias primas comprende la producción de un primer extracto de fermento o polvo de fermento, sometiendo una porción del primer extracto de fermento o polvo de fermento a al menos una fermentación adicional y mezclando esta porción con la porción restante del primer extracto de fermento o polvo de fermento, *i.e.* la fermentación es una fermentación en cascada.

- 15 La fermentación de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en presencia de microorganismos del género *Lactobacillus*, en particular microorganismos de la especie *Lactobacillus paracasei* y/o *Lactobacillus rhamnosus*.

- 20 Con respecto a las materias primas, las materias primas vegetales descritas anteriormente se utilizan en las combinaciones descritas anteriormente. Antes de la fermentación, se trituran de la forma habitual, por ejemplo, cortando y/o triturando. En otra realización del método de la invención, la materia prima vegetal que contiene el ingrediente activo de interés se fermenta o el ingrediente activo se agrega a la materia prima y/o al producto de fermentación.

- 25 La fermentación en cascada comprende la fermentación de materias primas vegetales en presencia de microorganismos para producir un extracto de fermento o polvo de fermento y el subsiguiente sometimiento de una porción del extracto de fermento o polvo de fermento a al menos una fermentación adicional. Para este propósito, preferiblemente hasta un tercio del extracto de fermentación anterior, que ha sido limpiado por centrifugación y filtración y secado si es necesario en el caso del polvo de fermentación, se separa y se vuelve a fermentar. En el curso posterior de la descripción, en aras de la simplificación, solo se menciona un extracto de fermento, lo que por supuesto también significa polvo de fermento seco.

- 30 La fermentación parcial se lleva a cabo normalmente a una temperatura en el intervalo de 20 ° C a 35 ° C, dependiendo de la temperatura del microorganismo utilizado. En general, la temperatura está entre 28 ° C y 32 ° C. El período de incubación también depende del microorganismo utilizado. Normalmente, el período de la fermentación parcial es más corto que el del primer lote, *i.e.* la fermentación inicial de la mezcla de materias primas naturales. A continuación, el fermento parcial se limpia como el primer extracto de fermento mediante centrifugación y filtración utilizando métodos convencionales. El fermento parcial limpio se mezcla luego con la parte restante del primer extracto de fermento. Preferiblemente, se añade una propagación de microorganismos a los extractos de fermentación combinados.

- 35 Ha resultado ventajoso realizar dos fermentaciones parciales. Esta variante del método está diseñada de tal manera que nuevamente se separa una porción del producto de fermentación, que se somete a una segunda fermentación adicional. Esta porción luego se mezcla con la porción restante. Se puede llevar a cabo cualquier número de fermentaciones parciales.

- 40 La fermentación de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en presencia de microorganismos del género *Lactobacillus*, en particular microorganismos de la especie *Lactobacillus paracasei* y/o *Lactobacillus rhamnosus*, utilizándose preferentemente el primero en la fermentación principal y después de mezclar el extracto del primer fermento con el extracto del fermentador principal, y el segundo preferentemente en la primera fermentación parcial. Con respecto a las cantidades de los microorganismos utilizados y el orden de adición en los extractos de fermentación individuales, se hace referencia explícita a las patentes europeas EP 1 153 549 B1 y EP 2 560 506 B1.

- 45 Las materias primas utilizadas son las materias primas vegetales ya descritas anteriormente en las combinaciones descritas anteriormente. Antes de la fermentación, se trituran de la forma habitual, por ejemplo, cortando y/o triturando. En otra realización del método de la invención, la materia prima vegetal que contiene el ingrediente activo de interés se fermenta o el ingrediente activo se agrega a la materia prima y/o al producto de fermentación. En cuanto a las cantidades de materias primas, se hace referencia explícita a las patentes europeas EP 1 153 549 B1 y EP 2 560 506 B1.

- 50 Asimismo, en cuanto a las condiciones exactas de fermentación, *inter alia* con respecto al suministro de soluciones nutritivas y otros aditivos, los valores de oxígeno, así como las diversas variantes de método posibles A y B se hace referencia a la patente europea EP 2 560 506 B1. Además, la fermentación de materias primas vegetales se describe en detalle en el Ejemplo 1 de la presente invención.

- 55 La recuperación o enriquecimiento de las vesículas de la invención a partir del producto de fermentación se realiza preferentemente mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad, electroforesis, cromatografía, método de columna, precipitación, liofilización, secado y/o nanofiltración. Los métodos para obtener o enriquecer vesículas

extracelulares y exosomas, respectivamente, se describen por ejemplo en los documentos EP 2 839 278 B1, WO 2013/158203 A1 o WO 2013/188832 A1.

5 Otra realización de la presente invención se relaciona con una composición que contiene las vesículas extracelulares de la invención y las producidas por el método de la invención. Utilizando el método descrito en los Ejemplos, se determinó el número de vesículas en el producto de fermentación de las materias primas vegetales. Para vesículas con un tamaño de aproximadamente 604 nm, se determinó un número de 0.25×10^{10} vesículas/ml, para vesículas con un tamaño de aproximadamente 378 nm, se determinó un número de 1.26×10^{10} vesículas/ml, para vesículas con un tamaño de aproximadamente 271 nm, se determinó un número de 1.25×10^{10} vesículas/ml y para vesículas con un tamaño de aproximadamente 181 nm, se determinó un número de 1.48×10^{10} vesículas/ml. En consecuencia, la presente invención proporciona composiciones en las que la concentración de las vesículas de la invención es superior a 1×10^8 /ml, de manera particular preferiblemente mayor que 1×10^9 /ml y especialmente de manera preferible mayor que 1×10^{10} /ml.

El tamaño de la EV en la composición de la presente invención está entre 150-210 nm, 240-300 nm, 350-410 nm y 575-635 nm, preferiblemente entre 175-185 nm, 265-275 nm, 375-385 nm y 600-610nm.

15 La composición de la invención es un producto natural, *i.e.* un producto biológico y puede ser utilizado para administración interna y externa. Para administración interna, se suele dar por vía oral como alimento o complemento alimenticio o fármaco. Puede administrarse en forma de líquido. También es posible formar un polvo o un liofilizado del mismo, que puede disolverse en agua u otro líquido si se requiere. También es ventajoso administrar el producto natural de la invención en forma de comprimidos, pastillas, gránulos, ampollas, gotas o aerosoles. En consecuencia, la composición de la invención puede ser un producto natural, fármaco, alimento para fines médicos especiales (dietas equilibradas), alimento dietético, suplemento alimenticio, producto cosmético o de cuidado corporal. Cuando sea apropiado, la composición de la invención comprende un portador y/o estabilizador farmacéutica o fisiológicamente aceptable. Estos son conocidos por la persona experimentada.

25 El producto natural producido de acuerdo con la invención también se puede aplicar externamente sobre la piel. También es posible utilizar el producto natural producido de acuerdo con la invención como producto cosmético, por ejemplo, incorporado en cremas, pomadas y espumas, con las que se aplica directamente sobre la piel. Los productos cosméticos tienen propiedades hidratantes y actúan como agentes antienvjecimiento.

Además, la presente invención comprende el uso de las vesículas de la invención o vesículas producidas de acuerdo con el método de la invención o la composición de la invención en la fabricación de alimentos, suplementos alimenticios, fármacos y/o en un producto cosmético o de cuidado personal.

30 Los métodos y procedimientos antes mencionados para la caracterización de las vesículas extracelulares de la invención pueden ser *inter alia* para analizar su cantidad, calidad, *i.e.* su estructura superficial y sus ingredientes. En particular, se pueden examinar las vesículas extracelulares que se originan a partir de los microorganismos utilizados en la fermentación y/o las materias primas vegetales, a partir de las cuales se puede derivar un beneficio terapéutico definido y específico. Por ejemplo, se puede determinar que las vesículas extracelulares obtenidas mediante fermentación con la adición del microorganismo X y/o con la adición de la materia prima Y tienen un beneficio en el tratamiento de la enfermedad Z por su número, calidad e ingredientes. El conocimiento de que las vesículas extracelulares están presentes en el producto de fermentación de las materias primas vegetales también se puede utilizar, por ejemplo, para el control de calidad de las fermentaciones de alimentos. Ya se ha demostrado que durante la muerte celular se liberaron más vesículas al medio, por lo que la cantidad de vesículas extracelulares presentes puede dar información sobre el estado del bioproceso (Zavec et al., *Biotechnol J.* 11 (2016), 603-609).

40 Los procesos y métodos para el aislamiento de vesículas extracelulares son conocidos en la técnica anterior, como el ExoQuick™ System (ExoQuick-TC) de Biosciences (SBI), Palo Alto, CA, EE. UU., que también se usa en los Ejemplos. Sin embargo, éstos aún no se han utilizado para el aislamiento de vesículas extracelulares con las características mostradas en los Ejemplos, en particular debido a su origen de un producto de fermentación y la distribución de tamaño observada, que se desvía considerablemente del tamaño observado con normalidad, esencialmente monótono en el intervalo de aproximadamente 50-200 nm. Un método de ejemplo para la insolación de EVs se caracteriza por

45 (a) poner en contacto una muestra de un producto de fermentación con una solución que comprende al menos un polímero que excluye el volumen para formar un complejo polímero-microvesículas; y
50 (b) separar el complejo polímero-microvesículas de la solución;

en donde el polímero preferiblemente es polietilenglicol, dextrano, sulfato de dextrano, acetato de dextrano, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo o sulfato de polivinilo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

55 Ejemplos

Ejemplo 1: producción de un producto de fermentación a partir de materias primas vegetales

Para la producción del producto de fermentación, de 70 a 100 kg de materias primas vegetales en forma de aproximadamente 25 % de limones, aproximadamente 18-20 % de dátiles deshuesados, aproximadamente 18-20 % de higos, aproximadamente 8-10 % de nueces, aproximadamente 6 % de cocos, aproximadamente 6 % de soja, aproximadamente 6 % de cebollas, aproximadamente 2.5 % de brotes de frijol mungo, aproximadamente 2.5 % de apio, aproximadamente 1 % de alcachofas, aproximadamente 0.75 % de mijo, aproximadamente 0.75 % de guisantes y de 80 a 100 l de agua.

Inicialmente, se prepararon tres lotes diferentes.

1) La soja y los guisantes se cocinaron durante 20 minutos y el mijo durante 10 minutos.

2) Los ingredientes frescos se lavaron con agua caliente entre 60 ° C y 80 ° C y se trituraron.

3) Un cultivo bacteriano (300 a 500 g *Lactobacillus paracasei*) se produjo incluyendo aproximadamente 1 kg de fructosa.

A continuación, los tres lotes se transfirieron a un biorreactor de 10,000 litros y se añadieron de 250 a 350 kg de lactosa como iniciadores de fermentación.

La primera fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 30 ° C a 32 ° C durante más de 2 semanas con una concentración de oxígeno de aproximadamente 0.2 g/kg y una concentración de CO₂ de aproximadamente 1.8 g/kg. Posteriormente, se extrajo una primera porción del biorreactor y se determinó el valor de pH de esta porción. Un segundo cultivo bacteriano *Lactobacillus rhamnosus* se añadió a esta porción. La segunda fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 30 ° C a 32 ° C durante aproximadamente 1/3 del tiempo de la primera fermentación. A continuación, se extrajo una segunda porción del biorreactor y se determinó el valor de pH de esta porción. Un cultivo bacteriano (*Lactobacillus paracasei*) más 1 kg de fructosa se añadió a esta porción.

La tercera fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 30 ° C a 32 ° C durante un período similar al de la segunda fermentación. Se mezclaron tres porciones en el biorreactor y luego se extrajo una tercera porción del biorreactor.

La porción se purificó por tamizado y posterior centrifugación. El proceso de purificación se llevó a cabo hasta alcanzar el grado de turbidez deseado.

Ejemplo 2: Cuantificación y determinación del tamaño de vesículas extracelulares y exosomas

El aislamiento de las vesículas extracelulares y exosomas del producto de fermentación de las materias primas vegetales descrito anteriormente se realizó utilizando el reactivo de aislamiento de exosomas TC ExoQuick™ disponible en el mercado de System Biosciences (CAT EXOTC10A-1) de acuerdo con el manual.

Para la posterior cuantificación y determinación del tamaño, se utilizó la técnica NanoSight™ mediante la cual se pueden visualizar, caracterizar y medir partículas pequeñas, que pueden ser tan pequeñas como 10 nm, en una solución. La tecnología NanoSight™ comprende una cámara científica, un microscopio y una unidad de adquisición de muestras. Este último utiliza un diodo láser para iluminar partículas en suspensión líquida que se mantienen en una cámara de flujo dentro de la unidad o que avanzan a través de ella. El dispositivo se usa junto con una unidad de control de computadora que opera un paquete de software personalizado de rastreo de nanopartículas (NTA). Con NTA, las partículas se rastrean y dimensionan automáticamente. Los resultados se muestran como un gráfico de distribución de frecuencia y se exportan en diversos formatos seleccionados por el usuario, incluidas hojas de cálculo y archivos de video. Además, los videoclips ricos en información se pueden capturar y archivar para futuras referencias y análisis alternativos. NTA permite la determinación de un perfil de distribución de tamaño de partículas pequeñas con un diámetro de aproximadamente 10-1000 nm en suspensión líquida.

Los resultados del análisis descrito mostraron que el producto de fermentación de las materias primas vegetales contiene vesículas extracelulares en diferentes tamaños y cantidades. En detalle, se pudo demostrar que aproximadamente 0.25 × 10¹⁰ vesículas/ml con un tamaño de 604 nm estaban presentes en el producto de fermentación, correspondientes a una proporción del 5.8 %; que aproximadamente 1.26 × 10¹⁰ vesículas/ml con un tamaño de 378 nm estaban presentes en el producto de fermentación, correspondientes a una proporción del 29.6 %; que aproximadamente 1.25 × 10¹⁰ vesículas/ml con un tamaño de 271 nm estaban presentes en el producto de fermentación, correspondientes al 29.2 %; que aproximadamente 1.48 × 10¹⁰ vesículas/ml con un tamaño de 181 nm estaban presentes en el producto de fermentación, correspondientes al 34.7 %. Los resultados se resumen en la Tabla 1 y los resultados de una medición representativa se muestran en la Figura 1.

Tabla 1: Diámetro, número por mililitro y participación porcentual de cuatro fracciones diferentes de vesículas extracelulares detectadas en el producto de fermentación de materias primas vegetales.

Tamaño de vesículas	Número de vesículas/ml	Participación porcentual
604 nm	0.25 × 10 ¹⁰	5.8 %
378 nm	1.26 × 10 ¹⁰	29.6 %

Tamaño de vesículas	Número de vesículas/ml	Participación porcentual
271 nm	1.25×10^{10}	29.2 %
181 nm	1.48×10^{10}	34.7 %

Ejemplo 3: Vesículas extracelulares aisladas de materia prima vegetal y bacteriana fermentado

Para poder sacar conclusiones sobre el origen de las vesículas extracelulares presentes en el producto de fermentación de materias primas vegetales, vesículas extracelulares aisladas de materia prima vegetal antes de la fermentación (jugo de limón exprimido) así como bacterias fermentadas solas (fermentación de 7 días de *Lactobacillus paracasei* con fructosa sin otras materias primas) y material vegetal fermentado (fermentación única de 7 días de limones y *Lactobacillus paracasei* bajo condiciones de laboratorio) fueron analizados y comparados. Las vesículas extracelulares se aislaron y analizaron como se describe en el Ejemplo 2, *i.e.* utilizando el sistema ExoQuick™ y la tecnología NanoSight™.

Los resultados, como se muestra en la figura 2, muestran que los componentes individuales del producto de fermentación, *i.e.* materias primas vegetales (zumo de limón exprimido) antes de la fermentación (figura 2A), así como las bacterias fermentadas sin más materias primas añadidas (aparte de la fructosa) (figura 2B) y materia prima vegetal fermentada (figura 2C) contienen vesículas extracelulares en diferentes tamaños y cantidades comparables a los resultados de los análisis representados en el Ejemplo 2. En particular, del zumo de limón exprimido se aislaron vesículas extracelulares con un tamaño entre aproximadamente 50 nm y 500 nm con picos a 80 nm, 128 nm, 156 nm, 240 nm, 289 nm, 347 nm, 463 nm y 500 nm (figura 2A). El producto de la fermentación de *Lactobacillus paracasei* con fructosa contenían vesículas extracelulares entre aproximadamente 100 nm y 1200 nm con picos a 193 nm, 253 nm, 398 nm, 468 nm, 547 nm, 668 nm, 826 nm y 1071 nm (figura 2B). Se aislaron vesículas extracelulares del producto de fermentación de limones fermentados por *Lactobacillus paracasei* con un tamaño entre aproximadamente 100 nm y 1200 nm con picos a 125 nm, 188 nm, 272 nm, 426 nm, 574 nm, 721 nm, 771 nm, 894 nm, 1046 nm y 1200 nm (figura 2C).

Ejemplo 4: Determinación de la actividad biológica de vesículas extracelulares

Los leucocitos de sangre periférica se utilizarán para realizar pruebas sobre la actividad biológica de las vesículas extracelulares derivadas del producto de fermentación de las materias primas vegetales.

Para el análisis de expresión de PGC-1-alfa, Nrf-2 y rodanasa, análisis de producción y viabilidad de ATP, primero se aíslan leucocitos de sangre periférica humana (PBMC) de la sangre completa de un donante voluntario y se ajustan a un número de células definido. Las PBMC se incuban con tres concentraciones diferentes de H₂O₂ durante 48 horas a 72 horas a 37 ° C y CO₂ al 5 %. La incubación ocurre en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de vesículas extracelulares. A esto le sigue el análisis de expresión de PGC-1-alfa, Nrf-2 y rodanasa, análisis de producción y viabilidad de ATP. La actividad biológica de EV está indicada por una mayor expresión y activación, respectivamente, de PGC-1alfa, Nrf-2 y/o rodanasa.

En otro experimento, se aíslan leucocitos de sangre periférica humana (PBMC) de la sangre completa de un donante voluntario y se ajustan a un número de células definido. Luego se analiza el índice de salud bioenergética celular (BHI), que incluye los siguientes parámetros:

- a) consumo de oxígeno mitocondrial y no mitocondrial
- b) producción de ATP mitocondrial y no mitocondrial
- c) fuga de protones
- d) capacidad respiratoria de reserva mitocondrial
- e) rata máxima posible de consumo de oxígeno mitocondrial
- f) efecto Crabtree
- g) efecto Warburg.

Los métodos para la detección de la actividad biológica de las vesículas extracelulares sobre la producción de energía de las células a través del aumento de la actividad mitocondrial son conocidos por la persona experimentada y se describen, por ejemplo, en Chacko et al., Clin. Sci. 127 (2014), 367-373; Dinkova-Kostova y Abramov, Free Radic. Biol. Med. 88 (2015), 179-188; Mimoun et al., Antioxid. Redox signal. 17 (2012), 1-10; y Puigserver, Int. J. Obes. 29 (2005), Suppl 1: S5-9. El análisis de los parámetros enumerados se realiza en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de las vesículas extracelulares. La actividad biológica de la EV está indicada por un aumento en el índice bioenergético celular (BHI). Alternativamente, las investigaciones se pueden realizar con células CACO-2 como se describe en Li et al., BMC Microbiology 17 (2017), 66.

La rata de consumo de oxígeno no mitocondrial (OCR) se determinó como un parámetro del BHI. Se aplicaron las siguientes proporciones de PBMC a EV: 1:1,000; 1:100; 1:10; 1:1; 1:0.1; 1:0.01; y 1:0 (sin), en donde se utilizaron 2.5×10^5 de PBMC y la concentración inicial de los EV fue de 4.21×10^{10} partículas/ml. El OCR no mitocondrial es un índice de procesos consumidores de oxígeno que no son mitocondriales. En leucocitos, la OCR no mitocondrial

generalmente aumenta en presencia de factores estresantes, incluidas las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y las especies reactivas de oxígeno (ROS), y se considera un indicador negativo de la salud bioenergética (Chacko et al., Clin. Sci. 127 (2014), 367-373).

- 5 Los resultados del tratamiento de PBMC con diferentes concentraciones de EV se muestran en la figura 3. La proporción de respiración no mitocondrial sobre la respiración total de las células no tratadas (sin) se establece en 100 %. Los datos indican que el tratamiento de las células con vesículas extracelulares reduce la respiración no mitocondrial. De ese modo, se observa una dependencia recíproca de dosis/efecto.

Ejemplo 5: Aislamiento de ácido nucleico de vesículas extracelulares

- 10 Con el fin de determinar que las vesículas extracelulares de la invención contienen biomoléculas tales como ácidos nucleicos, se aisló ADN y ARN de las vesículas extracelulares de la invención utilizando el Qiagen DNeasy Kit. De este modo, se pudieron aislar 1.2 µg de ADN y 13 µg de ARN a partir de vesículas extracelulares obtenidas mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 a partir de 10 ml del producto de fermentación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vesículas extracelulares (EV) derivadas de un producto de fermentación de materias primas naturales y microorganismos, en donde las materias primas naturales son materias primas vegetales y comprenden limones, dátiles deshuesados, higos, nueces, cocos, soja, cebollas, brotes de frijol mungo, apio, alcachofas, mijo y guisantes, y en donde las EV son de origen vegetal y microbiano, en donde la fermentación de las materias primas naturales comprende
- (a) la producción de un primer extracto de fermento o polvo de fermento;
- (b) someter una porción del primer extracto de fermento o polvo de fermento a al menos una fermentación adicional;
- 10 y
- (c) mezclar la porción o porciones de la fermentación o fermentaciones adicionales con la porción restante del extracto de primera fermentación o polvo de fermentación,
- en donde los microorganismos consisten en *Lactobacillus*, y en donde el tamaño de la EV está entre 150-210 nm, 240-300 nm, 350-410 nm y 575-635 nm, preferiblemente entre 175-185 nm, 265-275 nm, 375-385 nm y 600-610 nm, y en donde el tamaño de la EV se mide como se describe en el Ejemplo 2 de la descripción.
- 15 2. La EV de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un ingrediente activo de interés, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un ingrediente activo fitoquímico, moléculas de ácido nucleico, proteínas, lípidos y receptores de membrana.
3. Un método para la preparación o enriquecimiento de vesículas extracelulares (EV) como se define en la reivindicación 1 o 2 que comprende las etapas (a), (b) y (c) de la reivindicación 1 y que comprende una etapa de recuperación o enriquecimiento de la EV del producto de fermentación, opcionalmente en donde el ingrediente activo se agrega a la materia prima y/o al producto de fermentación.
- 20 4. Una composición que comprende EV de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 u obtenible mediante el método de la reivindicación 3, preferiblemente en donde la concentración de vesículas extracelulares es superior a 1×10^8 /ml, más preferiblemente mayor que 1×10^9 /ml e incluso más preferiblemente mayor que 1×10^{10} /ml.
- 25 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, preferentemente en forma líquida, polvo o liofilizada, que es un producto natural, fármaco, alimento, suplemento alimenticio, producto cosmético o de cuidado personal, opcionalmente en donde la composición comprende un portador y/o estabilizador farmacéutica o fisiológicamente aceptable.
- 30 6. Uso de EV de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 u obtenible mediante el método de acuerdo con la reivindicación 3 o una composición de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 en la fabricación de alimentos, suplementos alimenticios y/o en un producto cosmético o de cuidado personal.
7. EV de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 u obtenible mediante el método de acuerdo con la reivindicación 3 o una composición de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 para uso como un fármaco.
- 35

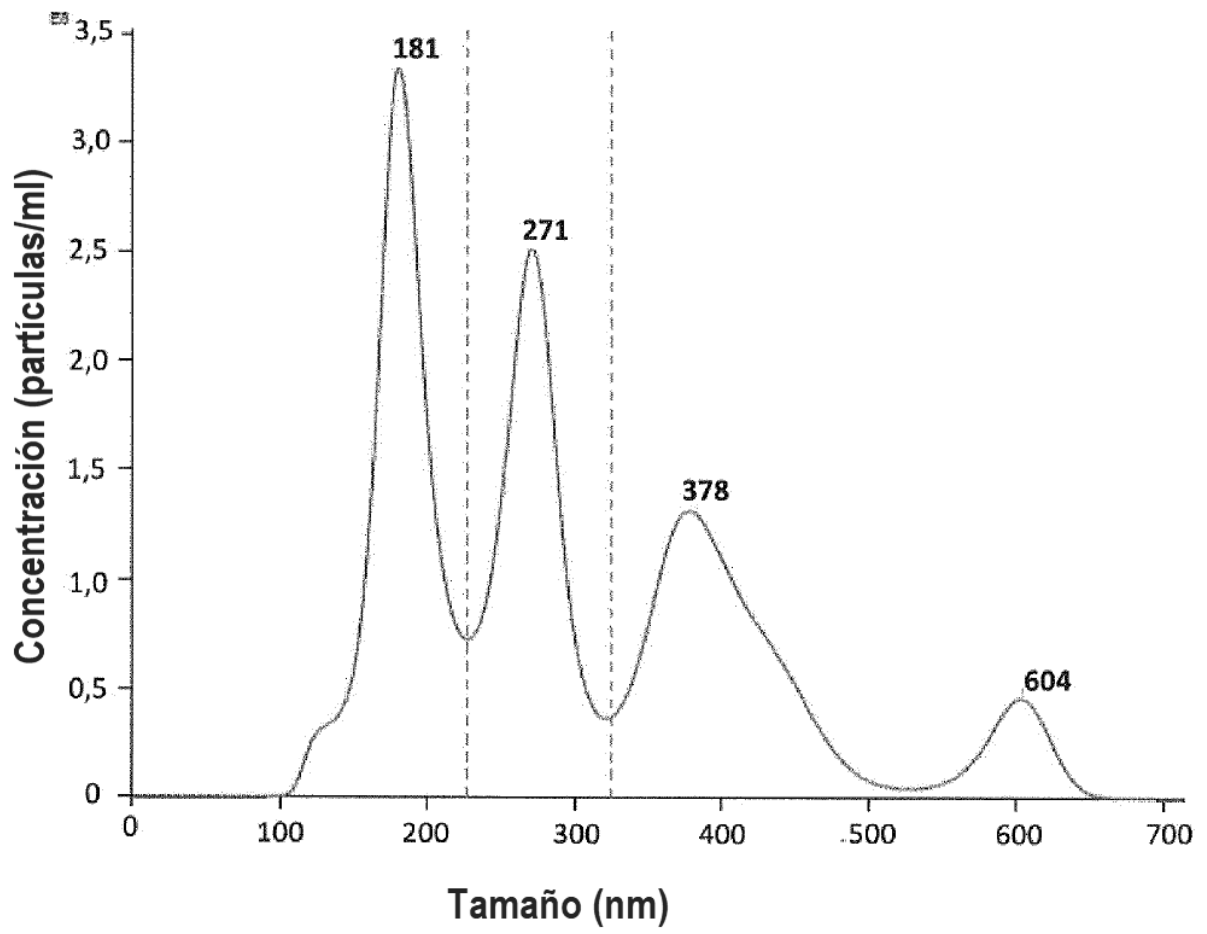


Fig. 1

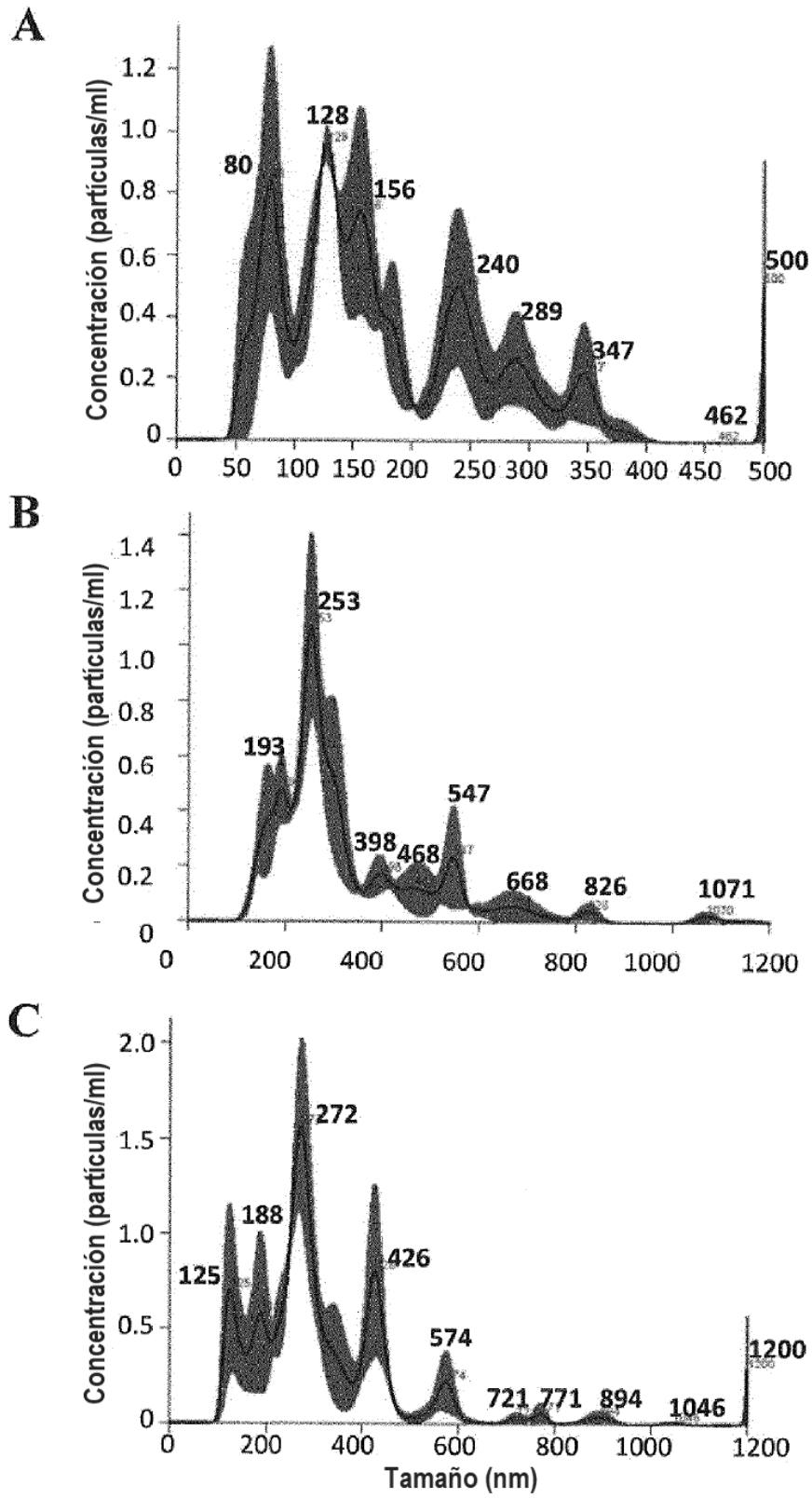


Fig. 2

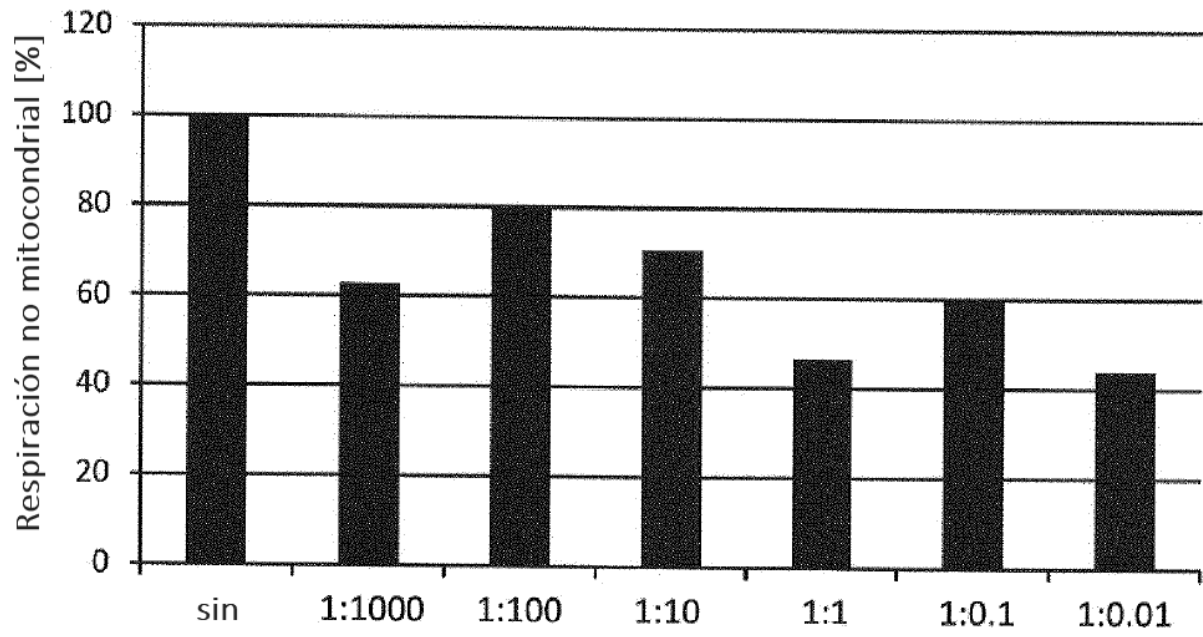


Fig. 3