



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014031666-0 B1



(22) Data do Depósito: 18/06/2013

(45) Data de Concessão: 04/10/2022

(54) Título: USO DE LACTOBACILLUS PARACASEI CBA L74 PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA TRATAR DOENÇA CELÍACA

(51) Int.Cl.: A61K 38/10; A61K 38/16; A61P 29/00; A61P 25/00; A61P 19/00.

(30) Prioridade Unionista: 13/11/2012 US 61/725,693; 18/06/2012 US 61/661,105.

(73) Titular(es): H.J. HEINZ COMPANY BRANDS LLC.

(72) Inventor(es): FRANCESCA ROMANA FASANO; ANDREA LUIGI BUDELLI.

(86) Pedido PCT: PCT US2013046286 de 18/06/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/192163 de 27/12/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/12/2014

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO, USO DE UM METABÓLITO E KIT A presente invenção refere-se a composições e métodos para tratar transtornos relacionados ao glúten. São descritas composições compreendendo um ou mais metabólitos produzidos pelo Lactobacillus paracasei CBA L74, Número de Acesso no Depositário Internacional LMG P- 24778, que reduzem a entrada na célula de peptídeos de gliadina. As composições podem incluir um veículo fisiologicamente aceitável, por exemplo, um produto alimentar ou um veículo farmacêutico. As composições podem ser administradas a um indivíduo portador de um transtorno relacionado ao glúten, por exemplo, doença celíaca ou sensibilidade ao glúten.

“USO DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* CBA L74 PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA TRATAR DOENÇA CELÍACA”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE PATENTE CORRELATOS

[0001] Este pedido de patente reivindica o benefício de prioridade deste, referente à data de depósito, ao Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 61/661 105, depositado em 18 de junho de 2012, e ao Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 61/725 693, depositado em 13 de novembro de 2012. Para fins de qualquer pedido de patente U.S. que possa vir a reivindicar o benefício de prioridade deste ao Pedido de Patente U.S. Provisório No. 61/661 105 e ao Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 61/725 693, os conteúdos daqueles pedidos de patente depositados antes são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção refere-se a organismos probióticos e a composições compreendendo metabólitos produzidos por organismos probióticos. Essas composições são úteis para o tratamento de transtornos relacionados ao glúten, por exemplo, doença celíaca.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] O glúten e polipeptídeos relacionados ao glúten são encontrados em muitos grãos de cereais, incluindo trigo, centeio e de cevada. Para indivíduos com transtornos relacionados ao glúten como doença celíaca e sensibilidade ao glúten, o consumo de alimentos contendo glúten pode ter consequências graves à saúde de longa duração. A doença celíaca é um transtorno autoimune do intestino delgado que é desencadeado pelo consumo de glúten em pessoas com predisposição genética. Certos fragmentos do glúten (“gliadinas”) estimulam uma resposta imune que danifica permanentemente o intestino delgado e impede a absorção de nutrientes. A doença celíaca pode apresentar-se com um amplo espectro de sintomas. Os mais comuns incluem diarreia crônica, distensão abdominal, perda de peso e déficit de crescimento

(em crianças). A doença celíaca pode também se associar com anemia por deficiência de ferro, osteoporose, baixa estatura, artrite, infertilidade, neuropatia periférica e insuficiência hepática. Os pacientes com doença celíaca também estão em risco aumentado para certos tipos de cânceres, como carcinomas do intestino delgado e linfoma não Hodgkin. Estima-se que a incidência da doença celíaca em populações de ascendência europeia é entre 0,5 e 1,5%. A incidência está crescendo tanto nos Estados Unidos como na Europa, além de na Ásia, onde, em parte, se deve à adoção de padrões dietéticos ocidentalizados. A doença celíaca é diagnosticada tipicamente na primeira infância ou durante a infância, embora os números de diagnósticos feitos na idade adulta estejam também se elevando. Atualmente, não há cura para a doença celíaca, e o tratamento padrão é uma restrição durante toda a vida a uma dieta sem glúten.

[0004] A sensibilidade ao glúten é menos bem caracterizada do que a doença celíaca. Manifesta-se com muitos dos mesmos sintomas, porém não inclui o dano ao intestino delgado. O diagnóstico tende a ser feito basicamente por critérios de exclusão, e os sintomas melhoram uma vez o paciente seja posto em uma dieta sem glúten.

[0005] A aderência a uma dieta sem glúten requer evitar rigorosamente produtos à base de trigo, centeio e de cevada. Isso pode representar um desafio, dado, muitas vezes, às informações na rotulagem acerca do teor de glúten de alimentos serem insuficientes; à oportunidade para contaminação durante o processamento e preparo de alimentos, especialmente para aqueles alimentos preparados fora de casa; à carga financeira de produtos livres de glúten e à força necessária para a aderência estrita. A aderência pode também ser afetada pelo acesso à educação e ao aconselhamento, pelo apoio familiar e social e por fatores psicológicos. Além do mais, a obediência estrita a uma dieta sem glúten pode resultar em deficiências de micronutrientes. Tais deficiências, especialmente nas vitaminas B

(vitamina B6, vitamina B12 e ácido fólico) e em certos elementos traços, por exemplo, ferro, zinco e de cobre, podem levar a problemas potencialmente significativos à saúde, especialmente em crianças. Há uma necessidade contínua de agentes terapêuticos para o tratamento de transtornos relacionados ao glúten.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[0006] A presente invenção provê composições compreendendo um ou mais metabólitos produzido pelo *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acesso do Depositário Internacional LMG P-24778. Os metabólitos podem reduzir a toxicidade de peptídeos de gliadina em um indivíduo portador de um transtorno relacionado ao glúten. Os metabólitos, que são substancialmente estáveis a temperaturas acima das temperaturas fisiológicas padrão, reduzem a entrada na célula de peptídeos de gliadina. O peptídeo de gliadina pode variar e incluir peptídeos que abrangem um ou mais epítomos reconhecidos pelas células T, por exemplo, P57-68, e peptídeos que são reconhecidos pelo sistema imune inato, por exemplo, P31-43. Os peptídeos exemplares incluem peptídeos de α -gliadina, por exemplo, peptídeos com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por LGQQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 1); QLQPFPPQLPY (SEQ ID NO: 2); LGQQQPFPPQQPYQPQPF (SEQ ID NO: 3); e LQLQPFPPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 4). Em algumas modalidades, os metabólitos são parcial ou substancialmente livres células do *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acesso do Depositário Internacional LMG P-24778. As composições podem também incluir um veículo fisiologicamente aceitável, por exemplo, um produto alimentar ou um veículo farmacêutico.

[0007] Adicionalmente, são providos métodos para tratar um indivíduo portador de um transtorno relacionado ao glúten, o método compreendendo identificar um indivíduo com necessidade de tratamento e administrar uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um metabólito produzido pelo *Lactobacillus*

paracasei CBA L74, Número de Acesso do Depositário Internacional LMG P-24778, em que o metabólito reduz a toxicidade de peptídeos de gliadina. Os métodos e as composições são úteis para o tratamento de qualquer transtorno relacionado ao glúten, inclusive doença celíaca, abrangendo os vários subtipos, por exemplo, doença celíaca clássica, doença celíaca atípica, doença celíaca latente e doença celíaca silenciosa, dermatite herpetiforme, ataxia por glúten e sensibilidade ao glúten. Os métodos e as composições podem ser administrados juntamente com terapias padrão para transtornos relacionados ao glúten, por exemplo, terapias dietéticas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

[0008] Estas e outras características e vantagens da presente invenção serão mais integralmente reveladas, ou tornadas óbvias, na descrição detalhada a seguir da modalidade preferida da invenção, a qual deverá ser considerada junto com os desenhos que a acompanham, em que números iguais referem-se a partes iguais e adicionalmente em que:

[0009] A Figura 1 é uma análise do efeito de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0010] A Figura 2 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito de diferentes concentrações de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0011] A Figura 3 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito de diferentes concentrações de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de 57-68^{liss} em células CaCo2.

[0012] A Figura 4 é uma análise do efeito do DNA de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0013] A Figura 5a é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2. A Figura 5b é uma análise do efeito do sobrenadante de

Lactobacillus paracasei, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0014] A Figura 6a é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P57-68^{liss} em células CaCo2. Figura 6b é uma análise do efeito do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P57-68^{liss} em células CaCo2.

[0015] A Figura 7a é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do tratamento pelo calor do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2. A Figura 7b é uma análise do efeito do tratamento pelo calor do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0016] A Figura 8 é uma análise do efeito do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 proveniente de arroz fermentado sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0017] A Figura 9 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 proveniente de arroz fermentado e de aveia fermentada sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0018] A Figura 10 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 proveniente de arroz fermentado e de aveia fermentada sobre a entrada de Dextran-Texas Red em células CaCo2.

[0019] A Figura 11 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de EGF conjugado a Alexa Fluor® em células CaCo2.

[0020] A Figura 12 é uma análise do efeito do sobrenadante de *Lactobacillus*

paracasei, cepa CBA L74 sobre a entrada de EGF conjugado a Alexa Fluor® em células CaCo2.

[0021] As Figuras 13a, 13b, 13c e 13d são uma análise do efeito do *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2. A Figura 13a mostra células controle não tratadas. A Figura 13b mostra células Caco2 tratadas com 10⁴ cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74. A Figura 13c mostra células Caco2 tratadas com 10⁶ cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74. A Figura 13d mostra células Caco2 tratadas com 10⁸ cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74.

[0022] A Figura 14 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito de diferentes concentrações de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0023] As Figuras 15a, 15b, 15c e 15d são uma análise do efeito do *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P57-68^{liss} em células CaCo2. A Figura 15a mostra células controle não tratadas. A Figura 15b mostra células Caco2 tratadas com 10⁴ cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74. A Figura 15c mostra células Caco2 tratadas com 10⁶ cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74. A Figura 15d mostra células Caco2 tratadas com 10⁸ cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74.

[0024] A Figura 16 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito de diferentes concentrações de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P57-68^{liss} em células CaCo2.

[0025] A Figura 17 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, 10⁸ cfu/ml, sobre a entrada de P31-43^{liss} e P57-68^{liss} em células CaCo2.

[0026] As Figuras 18a, 18b e 18c são uma análise do efeito do sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2. A Figura 18a mostra células controle não tratadas. A Figura 18b mostra células Caco2 tratadas com 10⁸ cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74. A Figura 18c mostra

células Caco2 tratadas com o sobrenadante coletado de 10^8 cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74.

[0027] A Figura 19 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito de células de *L. paracasei*, cepa CBA L74 e do sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0028] As Figuras 20a, 20b e 20c são uma análise do efeito do sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P57-68^{liss} em células Caco2. A Figura 20a mostra células controle não tratadas. A Figura 20b mostra células Caco2 tratadas com 10^8 cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74. A Figura 20c mostra células Caco2 tratadas com o sobrenadante coletado de 10^8 cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74.

[0029] A Figura 21 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito de células de *L. paracasei*, cepa CBA L74 e do sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P57-68^{liss} em células Caco2.

[0030] As Figuras 22a e 22b são uma análise do efeito do sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de EGF-Alexa 488 em células Caco2. A Figura 20a mostra células controle não tratadas. A Figura 20b mostra células Caco2 tratadas com o sobrenadante coletado do equivalente a 10^8 cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74.

[0031] A Figura 23 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de EGF-Alexa 488 em células Caco2.

[0032] As Figuras 24a, 24b e 24c são uma análise do efeito da remoção do sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células Caco2. A Figura 20a mostra células controle não tratadas. A Figura 20b mostra células Caco2 tratadas com o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74. A Figura 20c mostra células Caco2 tratadas com o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que havia sido removido.

[0033] A Figura 25 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do tratamento e depois da remoção do sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

[0034] As Figuras 26a, 26b, 26c e 26d são uma análise do efeito do tratamento pelo calor do sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células Caco2. A Figura 26a mostra células controle não tratadas. A Figura 26b mostra células Caco2 tratadas com o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74. A Figura 26c mostra células Caco2 tratadas com o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que havia sido fervido. A Figura 26d mostra células Caco2 tratadas com o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que havia sido tratado a 80 °C.

[0035] A Figura 27 é um gráfico retratando os resultados de uma análise do efeito do tratamento pelo calor do sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74 sobre a entrada de P31-43^{liss} em células CaCo2.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0036] Essa descrição de modalidades preferidas destina-se a ser lida com relação aos desenhos que a acompanham, os quais deverão ser considerados parte da descrição inteira redigida desta invenção. Os números não representam necessariamente a escala, e certas características podem ser mostradas em escala exagerada ou em forma um pouco esquemática no interesse da clareza e concisão. Na descrição, termos relativos como "horizontal", "vertical", "acima", "abaixo", "superior" e "inferior", bem como seus derivados (por exemplo, "horizontalmente", "para baixo", "para cima", etc.) devem ser interpretados o sentido de se referirem à orientação então descrita ou como mostrada no número em discussão. Esses termos relativos são por conveniência de descrição e, normalmente, sem a intenção de que exijam uma orientação em particular. Termos incluindo "para dentro" contra "para fora", "longitudinal" contra "lateral" e os semelhantes deverão ser interpretados em relação um ao outro ou em relação a um eixo de alongamento ou a um eixo ou centro

de rotação, conforme apropriado. Termos que dizem respeito a termos referentes a ligações, acoplamentos e os semelhantes, como "conectado" e "interconectado," referem-se a uma relação em que estruturas são presas ou anexadas uma a outra, seja direta ou indiretamente, por meio de estruturas interferentes, bem como ligações ou relações móveis ou rígidas, a menos que expressamente descrito de outra forma. O termo "operativamente conectado" é uma ligação, acoplamento ou conexão tal que permite que estruturas pertinentes operem conforme pretendido em virtude daquela relação. Quando apenas uma única máquina é ilustrada, será considerado que o termo "máquina" também inclui qualquer coleção de máquinas que individual ou conjuntamente executam um conjunto (ou múltiplos conjuntos) de instruções a serem executadas por uma ou mais das metodologias aqui discutidas. Nas reivindicações, cláusulas do tipo "*means-plus-function*" (meios mais função), se houver, destinam-se a abranger as estruturas descritas, sugeridas ou tornadas óbvias pelo texto da descrição ou dos desenhos que executam a função recitada, incluindo não só equivalentes estruturais, mas também estruturas equivalentes.

[0037] A presente invenção tem como base, em parte, a descoberta dos inventores de que culturas do organismo probiótico *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, podem reduzir a entrada de certos componentes do glúten em células intestinais humanas. Mais especificamente, os inventores descobriram que *L. paracasei* CBA L74 isolado e que sobrenadantes de culturas de *L. paracasei* CBA L74 reduzem a entrada de peptídeos de α -gliadina em células epiteliais intestinais humanas cultivadas. Além disso, a redução na entrada de peptídeos foi também observada para alimentos que haviam sido fermentados por *L. paracasei* CBA L74. O efeito sobre a entrada de peptídeos foi observado mesmo quando os sobrenadantes de cultura eram tratados com calor. Dessa forma, a invenção apresenta composições que podem abrandar os efeitos tóxicos de peptídeos de gliadina. As composições podem incluir células de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, metabólitos produzidos pelo

Lactobacillus paracasei, cepa CBA L74, ou uma combinação de células de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 e metabólitos produzidos pelo *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74.

[0038] O *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74 foi isolado pelos inventores e depositado, segundo os termos do Tratado de Budapeste sobre *The International Recognition of the Deposit of Micro-organisms for the Purposes of Patent Procedure* (A Autoridade Depositária Internacionalmente Reconhecida de microrganismos para fins de procedimento em matéria de patentes), em 09 de setembro de 2008 na Coordenação Belga de Coleções de Microrganismos (*Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms*, (BCCM), *Laboratorium voor Microbiologie* (LMG)), Ghent, Bélgica. O Número de Acesso fornecido pela Autoridade Depositária Internacional é LMG P-24778. Para facilidade de leitura, não se repetirá a expressão "Número de Acesso LMG P-24778" em todas as ocasiões. Deve-se entender que quando é feita referência ao *L. paracasei*, cepa CBA L74, esta diz respeito à cepa depositada com o Número de Acesso LMG P-24778.

[0039] Embora se acredite entender certos eventos ocorridos quando da administração de composições compreendendo ou preparadas por fermentação com *L. paracasei* CBA L74, as composições da presente invenção não se limitam àquelas que funcionam ao afetarem qualquer mecanismo celular em particular. A hipótese de trabalho dos inventores é que composições compreendendo *L. paracasei* CBA L74, sobrenadante de culturas ou fermentados por *L. paracasei* CBA L74 e metabólitos produzidos pelo *L. paracasei* CBA L74 podem aumentar a barreira para translocação de glúten e de polipeptídeos relacionados ao glúten através da mucosa intestinal e assim moderar os efeitos do glúten e de peptídeos relacionados ao glúten em indivíduos portadores de um transtorno relacionado ao glúten, por exemplo, doença celíaca ou sensibilidade ao glúten. Os inventores descobriram que o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, reduzia a captação celular de moléculas que penetram em

células através de diferentes vias endocitóticas, por exemplo, fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por clatrina (também chamada endocitose mediada por receptor) e via *caveolae* (pequenas cavidades). Por exemplo, o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, reduziu a entrada celular de dextrano, que é conhecido por penetrar em células via macropinocitose, e do fator de crescimento epidérmico (EGF), que entra nas células via endocitose mediada por receptor. Os efeitos benéficos das composições aqui descritas podem derivar-se, por exemplo, de metabólitos produzidos durante a fermentação, por exemplo, ácidos orgânicos como ácido láctico, ácido butírico ou ácido acético. Alternativa ou adicionalmente, fragmentos da parede celular bacteriana e outros componentes subcelulares bacterianos, como proteínas, fragmentos de ácidos nucleicos e lipídios, podem exercer efeitos sobre a resposta celular a glúten e a polipeptídeos relacionados ao glúten.

[0040] Dessa forma, a invenção apresenta composições e métodos que podem ser utilizados para proteger as células dos efeitos potencialmente tóxicos do glúten e de peptídeos relacionados ao glúten. As composições podem incluir o meio, no qual *L. paracasei* CBA L74, foi cultivado ou produtos alimentares, por exemplo, produtos lácteos ou produtos à base de cereais, que foram fermentados por *L. paracasei* CBA L74. Em algumas modalidades, o meio ou os produtos alimentares podem ser tratados, por exemplo, por métodos físico-químicos, como centrifugação, para remover todas ou substancialmente todas as células de *L. paracasei* CBA L74 que haviam sido cultivadas no meio ou no produto alimentar. Em algumas modalidades, as composições podem incluir *L. paracasei* CBA L74 isolado e um veículo fisiológico. O veículo pode ser um produto alimentar, mas a invenção não é assim limitada e, em algumas modalidades, o veículo pode ser um veículo farmacológico.

[0041] Além disso, são providos métodos para preparar e usar as

composições. Os métodos da invenção incluem método para produzir composições compreendendo *L. paracasei* CBA L74, métodos para fermentar produtos alimentares com *L. paracasei* CBA L74 e métodos para administrar as composições a um indivíduo portador de um transtorno relacionado ao glúten. Os métodos podem ser empregados em humanos ou na medicina veterinária. Independentemente do indivíduo (seja humano ou não humano), qualquer um dos presentes métodos pode incluir uma etapa para identificar o indivíduo. Por exemplo, os métodos podem incluir uma etapa para determinar se o indivíduo tem necessidade de tratamento.

COMPOSIÇÕES

L. paracasei CBA L74

[0042] As composições da invenção podem incluir o organismo probiótico, *L. paracasei* CBA L74. A Organização Mundial da Saúde definiu probióticos como: "Microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro". Em algumas modalidades, o *L. paracasei* CBA L74 pode ser submetido a tratamentos que os tornam não replicantes, por exemplo, exposição ao calor, irradiação γ ou irradiação UV. Um *L. paracasei* CBA L74 não replicante pode ser uma célula morta ou uma célula viva que se tornou incapaz de efetuar divisão celular. Um *L. paracasei* CBA L74 não replicante pode ser uma célula intacta ou uma célula que sofreu lise parcial ou completa. Em algumas modalidades, as células não replicantes podem incluir uma mistura de células intactas e lisadas.

[0043] Em algumas modalidades, as composições podem incluir produtos fermentados por *L. paracasei* CBA L74, dos quais todas as ou substancialmente todas as células de *L. paracasei* CBA L74 foram removidas. Métodos para separar células do meio de crescimento são bem conhecidos na técnica e podem basear-se em métodos físicos, por exemplo, centrifugação para produzir um *pellet* celular e um sobrenadante da cultura, filtração, ultrafiltração, filtração em fluxo tangencial, filtração

em fluxo normal ou osmose reversa. Alternativa ou adicionalmente, o método de separação pode ser à base de ligante e incluir, por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente ao *L. paracasei* CBA L74. O anticorpo pode estar acoplado a um suporte sólido como uma microesfera magnética.

[0044] As composições incluem um ou mais metabólitos do *L. paracasei* CBA L74, ou seja, qualquer substância produzida pelo *L. paracasei* CBA L74. O metabólito pode ser codificado por um ou mais genes ou pode ser gerado pela atividade enzimática de um ou mais produtos gênicos. Os metabólitos incluem, por exemplo, pequenas moléculas, por exemplo, aminoácidos, nucleosídeos, nucleotídeos, bem como estruturas poliméricas maiores como polipeptídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, proteoglicanos e lipídios. O metabólito pode ser um metabólito primário, por exemplo, um metabólito diretamente envolvido no funcionamento celular normal, ou um metabólito secundário, por exemplo, um metabólito tipicamente não necessário para funções celulares fundamentais. Um metabólito pode também incluir qualquer intermediário metabólico gerado durante a síntese de um metabólito primário ou secundário. Os intermediários podem incluir, entre outros, intermediários da via de Embden-Meyerhof, da via de pentose fosfato (pentose-P), da via de Entner-Doudoroff, do ciclo de citrato e da biossíntese de aminoácidos.

[0045] Os metabólitos primários exemplares incluem, entre outros, álcoois, por exemplo, etanol, metanol, butanol; aminoácidos, por exemplo, lisina, arginina, ornitina, histidina, citrulina, isoleucina, alanina, valina, leucina, glicina, treonina, serina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptofano, cisteína, cistina, metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, glutamina e asparagina; nucleotídeos, por exemplo, ácido guanílico 5'; antioxidantes, por exemplo, ácido ascórbico; ácidos orgânicos, por exemplo, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fórmico; vitaminas, por exemplo, vitamina B12; açúcares, ácidos graxos, por exemplo, ácidos graxos de cadeia curta; poliaminas; peptídeos, por exemplo, bacteriocinas como um lantibiótico, por exemplo,

nisina, ou um não lantibiótico, por exemplo, enterocina, plantaricina W, plantaricina S.

[0046] Um metabólito pode também ser um metabólito secundário. Os metabólitos secundários são tipicamente aqueles que não são necessários para funções celulares fundamentais. Os metabólitos secundários podem variar amplamente; os metabólitos secundários exemplares incluem antibióticos, hormônios, flavonoides, terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides, derivados fenílicos, derivados do hexanol, cumarinas, estilbenos, cianidrinhas, glicosinolatos, esteróis e saponinas.

[0047] Os lactobacilos produzem tipicamente os seguintes metabólitos durante a fermentação de produtos lácteos: ácido láctico/lactato, acetato, etanol, formato, acetaldeído, α -acetolactato, acetoína, diacetila e 2,3-butilenoglicol (butanodiol) durante a fermentação de produtos lácteos. A fermentação pode ser qualquer processo no qual um micróbio provoca uma decomposição, ou contribui, de uma substância orgânica complexa em substâncias mais simples.

[0048] O metabólito do *L. paracasei* CBA L74 pode estar contido dentro do meio, de fermentados ou sobrenadantes da cultura. Em algumas modalidades, o metabólito pode ser parcial ou substancialmente isolado do meio, de fermentados ou sobrenadantes da cultura. Assim, o metabólito funcional, ou seja, um metabólito que reduz a entrada na célula de um peptídeo de gliadina pode incluir ou excluir qualquer um dos metabólitos descritos acima. Os métodos de isolamento de metabólitos variarão de acordo com a estrutura e a química do metabólito específico. Um metabólito parcial ou substancialmente isolado reterá a atividade funcional, ou seja, a capacidade para reduzir a entrada na célula de peptídeos de gliadina, do meio, de fermentados ou sobrenadantes da cultura. Dessa forma, se um sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 puder reduzir a entrada de peptídeos de gliadina em células, prevê-se que um metabólito parcial ou substancialmente isolado do sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 também reduzirá a entrada de peptídeos de gliadina em células. Métodos padrão conhecidos na técnica podem ser

utilizados para o isolamento e a caracterização de metabólitos de *L. paracasei* CBA L74. Os métodos exemplares incluem, por exemplo, análises de estabilidade, por exemplo, estabilidade frente ao calor, pH, e/ou à atividade enzimática; análise cromatográfica, por exemplo, cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa, cromatografia em camada fina, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia de fase reversa; espectrometria de massa. Em algumas modalidades, o metabólito é estável frente ao calor, ou seja, retém sua atividade funcional, ou seja, a capacidade para impedir a entrada de peptídeos de gliadina na célula, após exposição a temperaturas fora da faixa fisiológica normal, por exemplo, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C ou 100 °C.

Glúten e peptídeos relacionados ao glúten

[0049] Independentemente da forma específica, as composições aqui descritas reduzem a captação celular de glúten e de polipeptídeos relacionados ao glúten. O glúten e os polipeptídeos relacionados ao glúten são as principais proteínas de armazenamento de grãos de cereais da dieta. O glúten é encontrado no trigo. As proteínas proximamente relacionadas, as hordeínas e as secalinas são encontradas na cevada e no centeio, respectivamente. Diversas centenas de genes codificadores de glúten e de proteínas relacionadas ao glúten foram descritas. Além de suas propriedades nutricionais, o glúten desempenha uma importante função na determinação da qualidade de panificação única do trigo ao conferir capacidade de absorção de água, coesividade, viscosidade e elasticidade à massa. O glúten na verdade é um complexo formado por duas frações polipeptídicas, as quais foram classificadas com base em sua solubilidade em álcoois aquosos: as gliadinas solúveis e as gluteninas insolúveis. As duas frações consistem em inúmeros componentes relacionados a proteínas, caracterizadas por alto teor de glutamina e prolina.

[0050] As gliadinas são proteínas monoméricas com pesos moleculares

(MWs) em torno de 28.000-55.000 e pontos isoelétricos de aproximadamente pH 3,0-4,0. Há quatro classes de polipeptídeos de gliadina: α -gliadina, β -gliadina, γ -gliadina e ω -gliadina. Sequências de aminoácidos exemplares para α -gliadina podem ser encontradas no GenBank em 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).

[0051] A glutenina é uma proteína multimérica maior com MW variando de cerca de 100.000 a mais de 10.000.000 com MW médio cerca de 3.000.000. Os pontos isoelétricos da glutenina variam de aproximadamente 6,5-7,0. Depois da redução de ligações dissulfeto, as subunidades resultantes da glutenina mostram solubilidade semelhante em álcoois aquosos às gliadinas. Com base na estrutura primária, as subunidades de glutenina foram divididas nas subunidades de alto peso molecular (HMW) (MW = 67.000-88.000) e as subunidades de baixo peso molecular (LMW) (MW = 32.000-35.000). Gliadinas, gluteninas, hordeínas e secalinas possuem alto teor de prolina e glutamina. O alto teor de prolina torna essas proteínas resistentes à digestão proteolítica completa por enzimas gástricas, pancreáticas e da borda em escova no intestino humano, pois aquelas enzimas são deficientes em atividade de prolil endopeptidase. Isso pode resultar no acúmulo de fragmentos peptídicos relativamente grandes (com até 50 aminoácidos no comprimento) com alto teor de prolina e glutamina no intestino delgado.

[0052] As sequências de aminoácidos específicas para gliadina podem variar, porém todas contêm epítomos para células T que desencadeiam as respostas imunes envolvidas na patogênese da doença celíaca. Essas respostas de células T específicas do glúten no intestino delgado desempenham uma importante função na produção da resposta inflamatória que resulta no final na característica marcante de atrofia de vilosidades intestinais e hiperplasia de criptas. Os peptídeos nativos

específicos ao glúten conseguem ligar-se a HLA-DQ2/8, os tipos de HLA mais fortemente associados com a doença celíaca. Essa ligação a HLA induz respostas de células T CD4 da lâmina própria, as quais, por sua vez, danificam a mucosa do intestino delgado. O dano ao tecido dá início à secreção da enzima transglutaminase tecidual transglutaminase (tTG) cicatrizante de feridas. No entanto, tTG também desamida peptídeos do glúten. A desamidação converte resíduos neutros de glutamina em resíduos de ácido glutâmico com carga negativa. Esses peptídeos desamidados aumentaram significativamente a afinidade de ligação por HLA-DQ2/8 em relação a peptídeos que não foram desamidados. Esse processo leva a uma apresentação antigênica intensificada de gliadina. A ligação de peptídeos desamidados ativa ainda células T *helper* 1 (Th1) CD4+ específicas ao glúten na lâmina própria, o que, por sua vez, aumenta a linfocitose intraepitelial, a hiperplasia de criptas, a produção de citocinas levando à atrofia vilositária e à expansão de células B que produzem anticorpos contra gliadina e tTG.

[0053] Múltiplos motivos de epítomos de células T foram identificados em α - e γ -gliadinas, bem como em gluteninas. A maioria destes mostrou reconhecimento intensificado por células T após a desamidação. Além do mais, os pacientes com doença celíaca são em geral sensíveis a mais de um peptídeo do glúten. Embora a interação com DQ2/8 represente a associação mais significativa com a doença celíaca até o momento definida, peptídeos não imunogênicos do glúten podem também ter impacto sobre o sistema imune inato.

[0054] Os peptídeos de gliadina P31-43 e P31-49 não são geralmente reconhecidos por células T. Esses peptídeos induzem uma resposta imune inata na mucosa celíaca. O peptídeo P31-43 retarda a maturação de vesículas endocíticas e, conseqüentemente, reduz a degradação de receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e prolonga a ativação de EGFR. A ativação prolongada de EGFR mostrou induzir maior proliferação celular e modificações da actina em enterócitos de

criptas na doença celíaca e em linhagens celulares cultivadas. Quando da entrada em enterócitos intestinais ou na linhagem de células intestinais humanas, CaCo2, P31-43 interage com vesículas endocíticas iniciais, reduz a sua mobilidade e retarda a sua maturação em endossomos tardios.

[0055] Diferentes peptídeos do glúten estão envolvidos no processo da doença celíaca. Há dois grupos de peptídeos biologicamente ativos que derivam de α -gliadina. O grupo de peptídeos contendo serina parece ser essencialmente citotóxico, enquanto o grupo contendo tirosina possui a capacidade para desencadear reações imunológicas em pacientes com doença celíaca. A atividade dos peptídeos contendo serina está ligada à presença dos motivos PSQQ e QQQP. Os peptídeos contendo tirosina, por exemplo, QQPY e/ou QPYP são associados com atividade imunológica.

[0056] Os peptídeos de gliadina podem variar amplamente em sequência. Um polipeptídeo com uma sequência que é idêntica a uma porção da sequência de α -gliadina e que funciona (por exemplo, para uma ou mais das finalidades descritas acima) é um peptídeo de gliadina. Uma gliadina completa inclui uma sequência peptídica de gliadina e um ou mais dos peptídeos aqui descritos podem situar-se parcial ou inteiramente dentro da sequência da gliadina. Um peptídeo com uma sequência que difere em certa medida de uma sequência que é encontrada em uma gliadina natural e que retém a capacidade para funcionar (por exemplo, retém atividade suficiente para conferir toxicidade ao peptídeo de gliadina) é uma variante biologicamente ativa de um peptídeo de gliadina. A tendência é de usar o termo “gliadina” para se referir a proteínas gliadinas naturais e de usar os termos “polipeptídeo” e “peptídeo” ao serem referidos seus fragmentos (ou seja, a fragmentos de gliadina) e suas variantes biologicamente ativas. Considerando que os polipeptídeos ou peptídeos podem ter uma sequência que é idêntica a uma sequência encontrada em gliadina, os polipeptídeos ou peptídeos são derivados de fragmentos

de gliadina.

[0057] Embora as sequências dos presentes polipeptídeos possam variar, os polipeptídeos úteis podem incluir fragmentos das SEQ ID NOs: 7-10. Os polipeptídeos podem incluir ou consistir em uma sequência de aminoácidos de uma gliadina que é naturalmente expressa em uma célula vegetal. Uma variante biologicamente ativa pode incluir, por exemplo, uma sequência de aminoácidos que diferente de um fragmento do tipo selvagem de uma gliadina em virtude de conter uma ou mais substituições conservadoras de aminoácidos. Em algumas modalidades, pelo menos 50% dos resíduos de aminoácidos da variante são idênticos aos resíduos no fragmento correspondente do tipo selvagem de uma gliadina. As variantes biologicamente ativas podem também incluir sequências de aminoácidos que diferente de um fragmento do tipo selvagem de uma gliadina em virtude de substituições não conservadoras, adições e/ou deleções de aminoácidos.

[0058] Refere-se a certas sequências de aminoácidos como “polipeptídeos” para transmitir que estas são polímeros lineares de resíduos de aminoácidos e para ajudar a distingui-las de proteínas completas. Será entendido que os polipeptídeos podem, portanto, incluir somente um fragmento de uma gliadina (ou sua variante biologicamente ativa), porém pode incluir também resíduos adicionais. Os polipeptídeos da invenção podem variar no comprimento. Por exemplo, os polipeptídeos podem ter 8-40 (por exemplo, 12, 14, 18, 18 ou 20) aminoácidos de comprimento ou serem mais longos (por exemplo, até aproximadamente 40 resíduos).

[0059] Os polipeptídeos que são variantes biologicamente ativas de uma gliadina podem ser caracterizados em termos do grau com o qual a sua sequência é similar ou idêntica ao fragmento correspondente da gliadina. Por exemplo, a sequência de uma variante biologicamente ativa pode ser pelo menos ou aproximadamente 60% idêntica a resíduos correspondentes em uma gliadina do tipo selvagem. Por exemplo, uma variante biologicamente ativa de um polipeptídeo de

gliadina pode ter uma sequência de aminoácidos com pelo menos ou aproximadamente 60% de identidade de sequência (por exemplo, pelo menos ou aproximadamente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência) com uma gliadina (por exemplo, com a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 7-10 ou com outro polipeptídeo como aqui descrito (por exemplo, um polipeptídeo representado, por exemplo, pelas SEQ ID NOs:1-6) ou com seu homólogo ou ortólogo).

[0060] Uma variante biologicamente ativa de um polipeptídeo de gliadina reterá atividade biológica suficiente para conferir toxicidade em um indivíduo portador de um transtorno relacionado ao glúten. A atividade biológica pode ser analisada de maneiras conhecidas pelo técnico no assunto e incluem, entre outros, ensaios de captação celular, ensaios de expressão gênica ou modelos animais *in vivo*. Variantes biologicamente ativas podem ser identificadas, por exemplo, comparando as atividades relativas do polipeptídeo variante com aquela de um fragmento ativo de um peptídeo de gliadina. Os ensaios podem incluir um polipeptídeo controle não relacionado (por exemplo, um que pudesse incluir, em qualquer determinado ensaio, um peptídeo com o mesmo teor de aminoácidos dispostos aleatoriamente, bem como um controle somente com veículo). Algumas variantes biologicamente ativas podem até mesmo ter atividade biológica maior do que o fragmento natural cognato ou uma gliadina completa. Mais especificamente, uma variante biologicamente ativa pode ter pelo menos ou aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou mais da atividade biológica do polipeptídeo na forma nativa.

[0061] Os peptídeos exemplares de α -gliadina que desempenham uma função na doença celíaca incluem P31-43, LGQQQPFPPQQPY, (SEQ ID NO.: 1); P31-49 LGQQQPFPPQQPYQPQPF (SEQ ID NO: 3); P44-55; PQQPFPSQLP (SEQ ID NO.: 5; P57-68 QLQPFQPQLPY (SEQ ID NO.: 2); P56-88, LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 4) e P63-76

QPQLPYPQPQLPYP (SEQ ID NO.: 6).

Produtos alimentares

[0062] As composições da invenção podem incluir um veículo fisiologicamente aceitável. O veículo fisiológico pode ser um produto alimentar ou um veículo farmacêutico. O termo “fisiologicamente aceitável” (ou “farmacologicamente aceitável”), quando usado, refere-se a entidades moleculares e composições que não produzem uma reação adversa, alérgica ou outra não desejada quando administradas a um animal ou um humano, conforme apropriado. Assim, as composições da invenção incluem produtos alimentares fermentados pelo organismo probiótico, *L. paracasei* CBA L74. O produto alimentar pode incluir células de *L. paracasei* CBA L74, sejam vivas ou não replicantes. Em algumas modalidades, o produto alimentar pode ser processado para remover todas ou substancialmente todas as células de *L. paracasei* CBA L74. Qualquer produto alimentar receptível à fermentação pelo *L. paracasei* CBA L74 pode ser usado. O produto alimentar pode ser um produto lácteo, por exemplo, leite ou um produto à base de leite. As fontes exemplares de leite incluem, entre outras, gado, ovelhas, cabras iaques, búfalas, éguas, mulas, renas e camelos. Independentemente da fonte, o leite ou os produtos lácteos podem estar em qualquer forma adequada para fermentação por *L. paracasei* CBA L74. Por exemplo, o leite pode ser leite integral ou leite que tenha sido processado para remover alguma ou toda a gordura butírica, por exemplo, leite com 2%, leite com 1% ou leite sem gordura. Alternativa ou adicionalmente, o leite pode ser previamente pasteurizado e/ou homogeneizado, seco e reconstituído, condensado ou evaporado. Frações de produtos lácteos incluindo caseína, proteína do soro de leite ou lactose podem também ser usadas. Em algumas modalidades, o produto lácteo pode constituir-se de aproximadamente 1% a aproximadamente 30% de pó de leite desnatado reconstituído, por exemplo, aproximadamente 2%, aproximadamente 5%, aproximadamente 7%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%,

aproximadamente 12%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30% de pó de leite desnatado reconstituído. Antes da fermentação, o produto lácteo pode ser combinado com um ou mais dos seguintes: a) um carboidrato (por exemplo, um dissacarídeo como dextrose ou um amido; b) um lipídio; c) uma vitamina e d) um mineral. Por exemplo, o pó de leite desnatado pode ser combinado com dextrose até aproximadamente 2%, por exemplo, aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,50%, aproximadamente 0,75%, aproximadamente 1,0%, aproximadamente 1,5% ou aproximadamente 2,0%.

[0063] O produto alimentar pode ser um produto à base de cereal, por exemplo, arroz, aveia, milho, sorgo ou painço. Em algumas modalidades, o produto à base de cereal pode ser de trigo, cevada, centeio ou tritcale. O produto à base de cereal pode ser um grão inteiro ou ser moído em farinha. O produto alimentar pode ser um único tipo de cereal ou uma mistura de dois ou mais tipos de cereais, por exemplo, farinha de aveia mais farinha de arroz. Os produtos à base de cereal podem ser de um grau e tipo adequados ao consumo humano ou podem ser produtos adequados ao consumo por animais domésticos. Em geral, o produto à base de cereal é hidratado antes da fermentação. A concentração do cereal pode variar, porém, as faixas úteis incluem de aproximadamente 5% a aproximadamente 50% em peso/volume, por exemplo, aproximadamente 8% em peso/volume, aproximadamente 10% em peso/volume, aproximadamente 12% em peso/volume, aproximadamente 15% em peso/volume, aproximadamente 18% em peso/volume, aproximadamente 20% em peso/volume, aproximadamente 22% em peso/volume, aproximadamente 25% em peso/volume, aproximadamente 30% em peso/volume, aproximadamente 35% em peso/volume, aproximadamente 40% em peso/volume, aproximadamente 45% em peso/volume ou aproximadamente 50% em peso/volume. As concentrações exemplares incluem 15% em peso/volume de arroz ou uma mistura de 18,5% em peso/volume de farinha de aveia mais 5% em peso/volume de farinha de cevada

maltada. O pH dos cereais hidratados pode ser ajustado usando qualquer ácido adequado ao consumo. O ácido pode ser, por exemplo, um ácido orgânico. Os ácidos orgânicos úteis incluem ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido adípico, ácido málico e ácido tartárico. Qualquer combinação de dois ou mais ácidos pode ser usada. Em algumas modalidades, o pH pode ser ajustado para aproximadamente 4,0 usando ácido cítrico.

[0064] O produto alimentar pode ser também um produto à base de vegetais ou de frutos, por exemplo, suco, purê, concentrado, pasta, molho, pickles ou *ketchup*. Os vegetais e frutos exemplares incluem, entre outros, sumos, por exemplo, de abobrinha, abobrinha amarela, abóbora menina, abóbora, batata, aspargos, brócolis, couve de Bruxelas, feijões, por exemplo, feijão verde, feijão-manteiga, feijão de Lima, feijão-fava, grão de soja, repolho, cenoura, couve-flor, pepino, couve-rábano, alho-porró, cebolinha, cebola, ervilha torta, ervilha inglesa, pimentas, nabo, couve-nabo, tomate, maçã, pera, pêssago, ameixa, morango, framboesa, amora, mirtilo, airela vermelha, amora preta, groselha, uvas, uva-passa, laranjas, limões, toranja, banana, manga, fruta kiwi e carambola.

[0065] O produto alimentar pode também ser um “leite” feito a partir de nozes de árvores ou legumes, por exemplo, leite de soja ou leite de amêndoa.

[0066] São também contemplados produtos alimentares compreendendo proteínas de animais, por exemplo, carne, por exemplo, salsichas, carnes secas, peixe e produtos derivados de peixe seco.

[0067] Independentemente do tipo de produto alimentar que é usado, o produto é combinado com *L. paracasei* CBA L74 e incubado a uma temperatura e por um tempo suficiente para que ocorra a fermentação. Qualquer método padrão de fermentação conhecido na técnica pode ser empregado. As condições específicas da fermentação variarão de acordo com muitos fatores, incluindo, por exemplo, o tipo de produto alimentar, a concentração do produto alimentar, o instrumental que é usado,

o volume de amostra, a concentração inicial do inóculo de *L. paracasei* CBA L74, a presença, se houver, de um coinóculo, as propriedades organolépticas do alimento fermentado e o uso pretendido do alimento fermentado.

[0068] O instrumental e o substrato (ou seja, o produto alimentar a ser fermentado) são esterilizados antes da inoculação com *L. paracasei* CBA L74 a fim de reduzir o nível de, ou eliminar, bactérias e/ou fungos e/ou vírus infecciosos viáveis. O instrumental pode ser esterilizado empregando métodos padrão ou de acordo com as instruções do fabricante. A escolha de um determinado método para esterilização do substrato dependerá, em parte, da estabilidade do substrato frente ao método de esterilização. Por exemplo, o substrato pode ser esterilizado por vapor e pressão, por exemplo, por autoclavagem, ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento (por exemplo, tindalização), exposição a altas pressões (por exemplo, pascalização), ultrafiltração ou radiação (por exemplo, exposição a raios gama, x, feixe de elétrons e/ou ultravioleta (comprimento de onda de 10 nm a 320 nm, por exemplo, 50 nm a 320 nm, 100 nm a 320 nm, 150 nm a 320 nm, 180 nm a 320 nm ou 200 nm a 300 nm)). Alíquotas do substrato podem ser removidas após o tratamento e semeadas em meio adequado para confirmar a ausência de contaminantes bacterianos e/ou fúngicos. Caso tenha sido esterilizado pela exposição a altas temperaturas, o substrato deve ser resfriado para pelo menos 37 °C antes da inoculação com *L. paracasei* CBA L74.

[0069] O substrato pode ser inoculado com *L. paracasei* CBA L74 de acordo com métodos padrão, por exemplo, proveniente de cultura líquida fresca ou uma cultura liofilizada que tenha sido ressuspensa em meio aquoso por um curto período de tempo antes da inoculação. Em geral, o *L. paracasei* CBA L74 é adicionado a concentrações de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ a aproximadamente 1×10^6 cfu/ml de substrato, por exemplo, aproximadamente 1×10^6 cfu/ml, aproximadamente 2×10^6 cfu/ml, aproximadamente 5×10^6 cfu/ml, 7×10^6 cfu/ml, 8×10^6 cfu/ml. A cultura deve ser suficientemente agitada para produzir uma distribuição relativamente uniforme de

bactérias e substrato, mas não excessivamente, pois *L. paracasei* CBA L74 é uma bactéria anaeróbica. Por exemplo, uma cultura de cinco litros pode ser agitada a aproximadamente 150 rpm. A temperatura de fermentação é geralmente a 37 °C. Vários parâmetros, por exemplo, o pH, a pressão parcial de O₂, a velocidade do agitador, temperatura, mistura de gases, nível de espuma e a concentração do substrato podem ser monitorados durante a fermentação e ajustados de acordo. O crescimento do *L. paracasei* CBA L74 pode ser monitorado usando métodos microbiológicos padrão. A fermentação é realizada até que a concentração de *L. paracasei* CBA L74 esteja próxima a entre aproximadamente 10⁸/ml e aproximadamente 10⁹/ml. Dependendo do substrato e de outras condições, essa concentração pode ser atingida em aproximadamente 10 até aproximadamente 30 horas depois da inoculação, por exemplo, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas.

[0070] Amostras do substrato podem ser analisadas antes, durante e depois da fermentação para assegurar a qualidade, empregando métodos microbiológicos padrão. Os métodos exemplares incluem, entre outros, crescimento em ágar de Rogosa para *L. paracasei* CBA L74, crescimento em ágar para contagem em placas (PCA) de aeróbicos totais, crescimento em ágar de McConkay para coliformes, crescimento em ágar reforçado para clostrídios (RCM) para *Clostridia*. Além de contagens de colônias, as morfologias das colônias podem ser observadas e comparadas a amostras de referência.

[0071] Em algumas modalidades, um coinóculo pode ser adicionado juntamente com o *L. paracasei* CBA L74 para ajudar a iniciar a fermentação. Os coinóculos úteis para a fermentação de produtos lácteos incluem, por exemplo, entre outros, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*,

Lactobacillus delbrueckii, subespécie *Bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* ou *Leuconostoc mesenteroides*. Em geral, a concentração do coínóculo será mais baixa do que aquela de *L. paracasei* CBA L74, por exemplo, aproximadamente $1 \times 10^4/\text{ml}$ a $10^5/\text{ml}$. A concentração final de *S. thermophilus* pode variar de aproximadamente $0,5 \times 10^8/\text{ml}$ a aproximadamente $2,5 \times 10^8/\text{ml}$.

[0072] Uma vez que concentrações adequadas de *L. paracasei* CBA L74 tenham sido atingidas, o alimento fermentado pode ser ainda processado para uso. Em algumas modalidades, o alimento fermentado pode ser fracionado para remover todas ou substancialmente todas as células de *L. paracasei* CBA L74. Em algumas modalidades, o pH do alimento fermentado pode ser ajustado, por exemplo, de aproximadamente 3,0 para mais próximo da neutralidade, por exemplo, 6,5, com a adição de NaOH ou KOH. Em algumas modalidades, o alimento fermentado pode ser seco. O produto alimentar fermentado pode ser seco por qualquer método conhecido na técnica que venha a resultar na retenção de propriedades imunoduladoras do alimento fermentado. Os métodos exemplares de secagem incluem secagem por aspersão, congelamento e desidratação, por exemplo, liofilização, ou secagem em tambor. O teor final de água do produto alimentar fermentado pode variar, mas pode ser entre aproximadamente 1% e aproximadamente 10% ou mais. Em algumas modalidades, o processo de secagem pode tornar o *L. paracasei* CBA L74 não replicante.

[0073] Os alimentos fermentados secos podem ser hidratados antes do uso. Dependendo da quantidade de líquido usada na hidratação, os produtos alimentares fermentados podem conter o 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} e, aproximadamente 10^{12} cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74. O *L. paracasei* CBA L74 seco não forma colônias, de modo que

se entende que essa quantidade é calculada com base no número de bactérias vivas que estavam presentes nos alimentos fermentados antes da etapa de secagem. Em algumas modalidades, os produtos alimentares fermentados podem incluir o equivalente de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^{12} cfu/g, por exemplo, aproximadamente 5×10^7 cfu/g, aproximadamente 1×10^8 cfu/g, aproximadamente 5×10^8 cfu/g, aproximadamente 1×10^9 cfu/g, aproximadamente 5×10^9 cfu/g, aproximadamente 1×10^{10} cfu/g, aproximadamente 5×10^{10} cfu/g, aproximadamente 1×10^{11} cfu/g, aproximadamente 5×10^{11} cfu/g de peso seco.

[0074] Dois ou mais produtos alimentares fermentados preparados pelos métodos da invenção podem ser combinados antes da administração. Por exemplo, produtos lácteos fermentados podem ser combinados com produtos fermentados à base de cereais. Alternativamente, o produto alimentar fermentado pode ser combinado com outros produtos alimentares, por exemplo, produtos alimentares não fermentados ou produtos alimentares fermentados utilizando outras cepas bacterianas. Qualquer combinação pode ser usada desde que os efeitos sobre peptídeos de gliadina do alimento fermentado sejam retidos. Os produtos alimentares exemplares incluem, entre outros, laticínios, por exemplo, leite, iogurte, coalhada, queijo, produtos à base de queijos, leites fermentados, produtos fermentados à base de leite, pós à base de leite, fórmulas para lactentes, alimentos espremidos para lactentes à base de leite, sorvete, gelatina, pudins, sopas, molhos, purés ou temperos, fórmulas nutricionais para os idosos; produtos à base de cereais, por exemplo, mingau, alimentos espremidos para lactentes à base de cereais, farinha de aveia, farinha, semolina, polenta, massas, biscoitos, biscoitos crocantes, barras energéticas; produtos de vegetais, por exemplo, purés, alimentos espremidos para lactentes à base de vegetais, vegetais em conserva, incluindo pepino, repolho, cenoura, pimentas ou temperos; produtos à base de frutos, por exemplo, alimentos espremidos para lactentes à base de frutos, purés, molhos, massas, *ketchups*, purés de frutos; ou

produtos à base de proteínas, por exemplo, legumes, salsichas, carnes frias, cachorro-quente ou carnes em purê. Em algumas modalidades, o alimento fermentado pode ser combinado com rações para animais de estimação ou rações para animais.

Composições farmacêuticas

[0075] As composições aqui descritas podem ser combinadas com um veículo farmaceuticamente aceitável. O termo "veículo farmaceuticamente aceitável," neste relatório descritivo, inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos, isotônicos e retardadores da absorção, tampões, excipientes, aglutinantes, lubrificantes, géis, surfactantes e semelhantes que podem ser usados como meio para uma substância farmaceuticamente aceitável.

[0076] Assim, a invenção também inclui composições farmacêuticas que contêm, como o ingrediente ativo, o *L. paracasei* CBA L74 ou um ou mais metabólitos produzidos por *L. paracasei* CBA L74 aqui descritos, em combinação com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis. Em algumas modalidades, o *L. paracasei* CBA L74 pode ser esterilizado empregando técnicas convencionais de esterilização antes ou depois de ser combinado com o veículo farmaceuticamente aceitável. No preparo das composições da invenção, o *L. paracasei* CBA L74 ou um ou mais metabólitos produzidos por *L. paracasei* CBA L74 são tipicamente misturados com um excipiente, diluídos por um excipiente ou inserido em tal veículo na forma de, por exemplo, uma cápsula, comprimido, sachê, papel ou outro recipiente. Quando serve como diluente, o excipiente pode ser um material sólido, semissólido ou líquido (por exemplo, solução salina normal), que atua como veículo, carreador ou meio para o ingrediente ativo. Assim, as composições podem estar na forma de comprimidos, pílulas, pós, losangos, sachês, envelopes, elixires, suspensões, emulsões, soluções, xaropes, aerossóis (como sólido ou em meio líquido), pomadas, cápsulas moles e duras de gelatina, supositórios, soluções estéreis injetáveis e pós estéreis embalados. Como é do conhecimento na técnica, o tipo de diluente pode variar dependendo da via de

administração pretendida. As composições resultantes podem incluir agentes adicionais, como conservantes. O excipiente ou veículo é selecionado com base no modo e na via de administração. Veículos farmacêuticos, bem como ingredientes farmacêuticos necessários ao uso em formulações farmacêuticas, estão descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (E. W. Martin), um texto de referência bem conhecido neste campo, e na USP/NF (Farmacopeia e Formulário Nacional dos Estados Unidos). Alguns exemplos de excipientes adequados incluem lactose, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, goma acácia, fosfato de cálcio, alginatos, tragacanta, gelatina, silicato de cálcio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, celulose, água, xarope e metilcelulose. As formulações podem adicionalmente incluir: agentes lubrificantes como talco, estearato de magnésio e óleo mineral; agentes hidratantes; agentes emulsionantes e de suspensão; agentes conservantes como metil e propil-hidroxi-benzoatos; agentes adoçantes; e agentes flavorizantes. As composições farmacêuticas podem ser formuladas para que proporcionem liberação rápida, sustentada ou retardada do ingrediente ativo após a administração ao paciente, empregando procedimentos conhecidos na técnica.

[0077] As composições farmacêuticamente aceitáveis para uso nos presentes métodos, incluindo aquelas nas quais *L. paracasei* CBA L74 ou um ou mais metabólitos produzidos por *L. paracasei* CBA L74 estão contidos em um coloide para liberação oral, podem ser preparadas de acordo com técnicas padrão. O *L. paracasei* CBA L74 ou um ou mais metabólitos produzidos por *L. paracasei* CBA L74 podem ser secos e compactados por moagem ou pulverização e inseridos em uma cápsula para administração oral. Em algumas modalidades, o *L. paracasei* CBA L74 ou um ou mais metabólitos produzidos por *L. paracasei* CBA L74 podem ser combinados com um ou mais excipientes, por exemplo, um desintegrante, um agente de preenchimento, um deslizante ou um conservante. As cápsulas adequadas incluem cápsulas de invólucro duro ou cápsulas de invólucro mole. Qualquer coloide à base de lipídios ou à base de

polímeros pode ser usado para formar a cápsula. Os polímeros úteis exemplares para o preparo de coloides incluem gelatina, polissacarídeos vegetais ou seus derivados, como carrageninas, e formas modificadas de amido e celulose, por exemplo, hipromelose. Opcionalmente, outros ingredientes podem ser adicionados à solução do agente gelificante, por exemplo, plastificantes, como glicerina e/ou sorbitol, para diminuir a dureza da cápsula, agentes corantes, conservantes, desintegrantes, lubrificantes e de tratamento à superfície. Em algumas modalidades, a cápsula não inclui gelatina. Em outras modalidades, a cápsula não inclui polissacarídeos vegetais ou seus derivados.

[0078] Independentemente da sua fonte original ou da maneira na qual são obtidos, o *L. paracasei* CBA L74 ou um ou mais metabólitos produzidos por *L. paracasei* CBA L74 podem ser formulados de acordo com o seu uso. Essas composições podem ser preparadas de uma maneira conhecida na técnica farmacêutica, e podem ser administradas por uma variedade de vias, dependendo se o tratamento local ou sistêmico é desejado ou da área a ser tratada. A administração pode ser oral ou tópica (incluindo liberação oftálmica ou a membranas mucosas, entre estas, intranasal, vaginal e retal). Em algumas modalidades, a administração pode ser pulmonar (por exemplo, por inalação ou insuflação de pós ou aerossóis, incluindo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica e transdérmica) ou ocular. Os métodos para liberação ocular podem incluir administração tópica (gotas oculares), subconjuntival, periocular ou por injeção intravítrea ou introdução por cateter-balão ou insertos oftálmicos posicionados no saco conjuntival. A administração parenteral inclui injeção ou infusão intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular; ou administração intracraniana, por exemplo, intratecal ou intraventricular. A administração parenteral pode ser na forma de uma dose única em bólus, ou pode ser, por exemplo, por uma bomba de perfusão contínua. As composições farmacêuticas e formulações para administração tópica podem incluir

adesivos intradérmicos, pomadas, loções, cremes, géis, gotas, supositórios, sprays, líquidos, pós e os semelhantes. Veículos farmacêuticos convencionais, aquosos, bases em pó ou oleosas, espessantes e os semelhantes podem ser necessários ou desejáveis.

[0079] As composições podem ser formuladas em forma de dose unitária, cada dose contendo, por exemplo, de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 2000 mg de *L. paracasei* CBA L74 ou de um ou mais metabólitos produzidos por *L. paracasei* CBA L74, por dose diária. Em algumas modalidades, as composições podem conter o 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} e aproximadamente 10^{12} cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74. O termo "forma de dose unitária" refere-se a unidades fisicamente distintas, adequadas como doses unitárias para humanos e outros mamíferos, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material ativo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com um excipiente farmacêutico adequado. Para preparar composições sólidas, tais como comprimidos, o ingrediente ativo principal é misturado com um excipiente farmacêutico para formar uma composição sólida previamente formulada, contendo uma mistura homogênea de um composto da presente invenção. Quando essas composições previamente formuladas são referidas como homogêneas, o ingrediente ativo está tipicamente disperso uniformemente por toda a composição de modo que a composição possa ser rapidamente subdividida em formas igualmente eficazes de dose unitária, tais como comprimidos, pílulas e cápsulas. Essa formulação prévia sólida é depois subdividida em formas de dose unitária do tipo descrito acima, contendo de, por exemplo, 0,005 mg a aproximadamente 1000 mg do *L. paracasei* CBA L74 ou de um ou mais metabólitos produzidos por *L. paracasei* CBA L74 da presente invenção.

[0080] As composições podem ser formuladas em uma forma de dose unitária, cada dose contendo, por exemplo, 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 de 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 do ingrediente ativo.

[0081] Em algumas modalidades, os comprimidos ou pílulas da presente invenção podem ser revestidos ou de outra forma compostos para fornecer uma forma farmacêutica que ofereça a vantagem de ação prolongada. Por exemplo, o comprimido ou pílula podem compreender um componente interno e um componente externo de forma farmacêutica, sendo o último na forma de envelope sobre o primeiro. Os dois componentes podem ser separados por uma camada entérica que tem como função resistir à degradação no estômago e permitir que o componente interno

permaneça intacto durante a passagem no duodeno ou que a sua liberação seja retardada. Uma variedade de materiais pode ser usada para tais camadas ou revestimentos entéricos, em que tais materiais incluem uma série de ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com tais materiais, como *shellac*, álcool cetílico e acetato de celulose.

[0082] As formas líquidas nas quais as composições da presente invenção podem ser incorporadas para administração por via oral ou por injeção incluem soluções aquosas, xaropes com sabor adequadamente adicionado, suspensões aquosas ou oleosas e emulsões com sabor adicionado por óleos comestíveis, tais como óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, óleo de coco ou óleo de amendoim, bem como elixires e veículos farmacêuticos semelhantes.

[0083] A proporção ou concentração das composições da invenção em uma composição farmacêutica pode variar dependendo de uma série de fatores, incluindo dose, características químicas (por exemplo, hidrofobicidade) e a via de administração. Por exemplo, o *L. paracasei* CBA L74 ou um ou mais metabólitos produzidos por *L. paracasei* CBA L74 da invenção podem ser fornecidos em uma cápsula contendo de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 1000 mg para administração oral.

MÉTODOS DE USO

Transtornos relacionados ao glúten

[0084] As composições aqui reveladas são em geral e úteis de modo variado para o tratamento de transtornos relacionados ao glúten. Os indivíduos para quem tal tratamento é benéfico incluem aqueles que sofrem ou que estão em risco de efeitos tóxicos quando da ingestão de glúten e de polipeptídeos relacionados ao glúten. Tais efeitos tóxicos podem abranger um amplo espectro de sintomas, incluindo, entre outros, inflamação, reações autoimunes, sintomas gastrointestinais tais como diarreia, esteatorreia, distensão abdominal, perda de peso, anemia, osteoporose, artrite,

infertilidade, neuropatia periférica, insuficiência hepática e depressão. A toxicidade de peptídeos de gliadina pode derivar-se de mecanismos citotóxicos ou imunológicos, ou uma combinação de mecanismos citotóxicos e imunológicos. Um sintoma de toxicidade de peptídeos de gliadina pode incluir inflamação, reações autoimunes, sintomas gastrointestinais como diarreia, esteatorreia, distensão abdominal, perda de peso, anemia, osteoporose, artrite, infertilidade, neuropatia periférica, insuficiência hepática e depressão. Os transtornos relacionados ao glúten abrangem doença celíaca, incluindo os vários subtipos, por exemplo, doença celíaca clássica, doença celíaca atípica, doença celíaca latente e doença celíaca silenciosa, dermatite herpetiforme, ataxia por glúten e sensibilidade ao glúten.

[0085] Os subtipos de doença celíaca incluem doença celíaca clássica, doença celíaca atípica, doença celíaca latente e doença celíaca silenciosa. Os sintomas clássicos associados com a doença celíaca são diarreia, distensão abdominal e déficit de crescimento. Esses sintomas são vistos mais comumente em crianças entre 6 e 24 meses de idade. A doença celíaca atípica é caracterizada por sintomas gastrointestinais mais leves. Esse subtipo está associado com manifestações extraintestinais, como anemia por deficiência de ferro, osteoporose, baixa estatura, artrite, infertilidade, neuropatia periférica, hipertransaminasemia e, em alguns casos, insuficiência hepática no momento do diagnóstico. A doença celíaca latente aplica-se a pacientes portadores de HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8, com ou sem sorologia positiva, e que não desenvolveram ainda atrofia vilositária, mas podem apresentar leve inflamação leve ou ativação imune. Os pacientes nesse subconjunto podem ser assintomáticos ou apresentar manifestações extraintestinais. A doença celíaca silenciosa é caracterizada por sorologia positiva e atrofia vilositária em um paciente do contrário assintomático. Depois de empreenderem uma dieta livre de glúten, alguns pacientes assintomáticos notarão melhora em diferentes aspectos físicos e psicológicos de suas vidas, tais como apetite melhorado, fadiga reduzida ou

menos anormalidades comportamentais. Independentemente do subtipo, muitos casos de doença celíaca não são diagnosticados, e expõem pacientes ao risco de complicações tardias, por exemplo, infertilidade e malignidades, por exemplo, linfoma e carcinoma intestinal.

[0086] A apresentação da doença celíaca pode variar bastante. A doença celíaca tipicamente apresenta-se em crianças como uma doença de déficit do crescimento associada com sintomas clássicos de má absorção: predominantemente perda de peso, esteatorreia e deficiências múltiplas, embora possam estar presentes outros sintomas extraintestinais, por exemplo, déficit no desenvolvimento axial da altura e menarca retardada em meninas.

[0087] A prevalência de doença celíaca é maior em condições nas quais há risco, como histórico familiar de doença celíaca, doenças autoimunes, deficiência de IgA, algumas síndromes genéticas (síndrome de Down, síndrome de Turner e síndromes de William) e especialmente diabetes tipo 1 e tireoidite.

[0088] A predisposição genética desempenha uma função significativa na doença celíaca. A doença celíaca está fortemente associada com genes específicos do antígeno leucocitário humano (HLA) da classe II, HLA-DQ2 e HLA-DQ8, situados no cromossomo 6p21. A maioria dos pacientes com doença celíaca (aproximadamente 95%) expressa genes codificadores da proteína HLA-DQ2 classe II do principal complexo de histocompatibilidade (MHC). Os demais pacientes são habitualmente positivos para HLA-DQ8. O haplotipo HLA-DQ2 é comum e carregado por aproximadamente 30% dos caucasianos, implicando que a presença de HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 é necessária para o desenvolvimento da doença, mas não suficiente por si só, pois seu efeito estimado no risco é de somente 36% a 53%. Genes não de HLA também contribuem para a predisposição à doença celíaca.

[0089] O diagnóstico de doença celíaca baseia-se tipicamente em critérios múltiplos, incluindo: 1) apresentação com sintomas típicos da doença celíaca; 2)

positividade de testes sorológicos, incluindo, por exemplo, alto título de anticorpos IgA contra tTG (anti-tTG), altos títulos de anticorpos contra peptídeos desamidados de α -gliadina; 3) genótipos HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8; 4) enteropatia celíaca encontrada na biópsia do intestino delgado; e 5) resposta a uma dieta livre de glúten. A grande variabilidade de apresentação da doença celíaca motivou alguns clínicos a adotarem uma abordagem quantitativa, definida como a “regra quatro de cinco”. Ou seja, o diagnóstico de doença celíaca é confirmado se pelo menos quatro dos cinco critérios são satisfeitos.

[0090] A dermatite herpetiforme é uma manifestação cutânea da doença celíaca, que se apresenta como erupção com formação de bolhas e depósitos patognomônicos de IgA na pele. Os sintomas predominantes são coceira e ardência intensas. A erupção cutânea possui uma distribuição simétrica característica. Os cotovelos e a região superior dos antebraços são afetados em mais de 90% dos pacientes. Outros locais comumente envolvidos são as nádegas, os joelhos, os ombros, o sacro, a face, o couro cabeludo, o pescoço e o tronco. Atrofia vilositária do tipo da doença celíaca, na região superior da mucosa do intestino delgado, é encontrada em 65% a 75% dos pacientes com dermatite herpetiforme. Mesmo em pacientes com biópsias aparentemente normais, alterações sutis na mucosa, como número aumentado de linfócitos intraepiteliais, indicam sensibilização ao glúten. Os pacientes com dermatite herpetiforme podem exibir um arranjo de manifestações, transtornos associados e complicações como em pacientes portadores de doença celíaca (doenças autoimunes, anemia por deficiência de ferro, osteoporose e malignidade). Os pacientes com dermatite herpetiforme são geralmente postos em uma dieta livre de glúten, já que a erupção cutânea da dermatite herpetiforme é sensível ao glúten.

[0091] Ataxia por glúten foi definida como ataxia esporádica de outra forma idiopática com marcadores sorológicos positivos para sensibilização ao glúten. Do

mesmo modo que na doença celíaca, é uma doença autoimune caracterizada por dano ao cerebelo resultando em ataxia. Os pacientes com ataxia por glúten apresentam tipicamente alto título de anticorpos anti-gliadina. O depósito disseminado de anticorpos contra transglutaminase foi encontrado em volta de vasos cerebrais de pacientes com ataxia por glúten. A ataxia por glúten habitualmente apresenta-se com ataxia cerebelar pura ou, raramente, ataxia combinada com mioclonia, tremor palatal ou opsoclonia-mioclonia. A ataxia por glúten é habitualmente de início insidioso com idade média no aparecimento de 53 anos. Em muitos pacientes, haverá evidência de enteropatia na biópsia intestinal. Pacientes positivos para anticorpos anti-gliadina ou anticorpos anti-tTG sem qualquer causa alternativa para sua ataxia são normalmente postos em uma dieta rigorosa livre de glúten com acompanhamento regular.

[0092] A sensibilidade ao glúten, também chamada de sensibilidade ao glúten não celíaca ou intolerância ao glúten, é geralmente caracterizada como um transtorno funcional, morfológico e imunológico, no qual faltam todas as características da doença celíaca, mas que, não obstante, responde à exclusão do glúten. A sensibilidade ao glúten é distinta da doença celíaca e não é acompanhada por autoanticorpos anti-tTG ou outras comorbidades autoimunes. O intestino delgado de pacientes com sensibilidade ao glúten é tipicamente normal. Os sintomas da sensibilidade ao glúten podem assemelhar-se àqueles associados com a doença celíaca, porém com uma prevalência de sintomas extraintestinais, como alterações comportamentais, dor óssea ou articular, câimbras musculares, dormência nas pernas, perda de peso e fadiga crônica. Não há biomarcadores laboratoriais específicos para sensibilidade ao glúten. O diagnóstico normalmente baseia-se em critérios de exclusão; uma dieta com eliminação de alimentos contendo glúten, seguida por um desafio aberto é o mais frequentemente usado para avaliar melhoras na saúde com a eliminação ou redução de glúten na dieta dos pacientes.

Métodos de tratamento

[0093] Um indivíduo é tratado eficazmente sempre que um benefício clinicamente benéfico resulta. O benefício pode significar, por exemplo, resolução completa dos sintomas associados com um transtorno relacionado ao glúten, redução na gravidade dos sintomas associados com um transtorno relacionado ao glúten ou desaceleração da progressão de sintomas associados com um transtorno relacionado ao glúten. Esses métodos podem incluir ainda as etapas de a) identificar um indivíduo (por exemplo, um paciente e, mais especificamente, um paciente humano) portador de um transtorno relacionado ao glúten; e b) fornecer ao indivíduo uma composição compreendendo *L. paracasei* CBA L74 ou um ou mais metabólitos de *L. paracasei* CBA L74 aqui descritos, tal como qualquer produto alimentar fermentado ou composição compreendendo *L. paracasei* CBA L74 em um veículo fisiologicamente aceitável. Uma quantidade de tal composição fornecida ao indivíduo que resulta em resolução completa dos sintomas associados com um transtorno relacionado ao glúten, redução na gravidade dos sintomas associados com um transtorno relacionado ao glúten ou desaceleração da progressão de sintomas associados com um transtorno relacionado ao glúten é considerada uma quantidade terapeuticamente eficaz. Os presentes métodos podem também incluir uma etapa de monitoramento como ajuda para otimizar a administração e esquema, bem como para predizer o resultado.

[0094] Os métodos aqui revelados podem ser aplicados a uma grande variedade de espécies, por exemplo, humanos, primatas não humanos (por exemplo, macacos), cavalos, suínos, vacas ou outros animais de criação, cães, gatos ou outros mamíferos mantidos por estimação, ratos, camundongos ou outros animais de laboratório. As composições aqui descritas são úteis em composições e esquemas terapêuticos ou para a produção de um medicamento para uso no tratamento de condições como as descritas acima (por exemplo, um transtorno relacionado ao glúten).

[0095] As composições aqui descritas podem ser administradas por via oral

como parte da dieta diária comum de um indivíduo. As composições alimentares podem ser administradas como suporte nutricional para crianças e adultos. Quando formuladas como produtos farmacêuticos, as composições podem ser administradas a qualquer parte no corpo do hospedeiro para liberação subsequente a um alvo celular. Uma composição pode ser liberada, entre outros, ao cérebro, ao líquido cefalorraquidiano, a articulações, à mucosa nasal, ao sangue, aos pulmões, aos intestinos, a tecidos musculares, à pele ou à cavidade peritoneal de um mamífero. Em termos de via de liberação, uma composição pode ser fornecida por administração intravenosa, intracraniana, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intramuscular, intrarretal, intravaginal, intratecal, intratraqueal, intradérmica ou por injeção transdérmica, por administração oral ou nasal ou por perfusão gradual ao longo do tempo. Em ainda outro exemplo, um preparado em aerossol de uma composição pode ser fornecido a um hospedeiro por inalação.

[0096] Independentemente de as composições serem formuladas como produtos alimentares ou como produtos farmacêuticos, a dose necessária dependerá da via de administração, da natureza da formulação, da natureza da condição individual, por exemplo, imaturidade do sistema imune ou um transtorno gastrointestinal, do tamanho, peso, área de superfície, idade e sexo do indivíduo, de outros fármacos em administração e do juízo dos clínicos responsáveis pelo tratamento. As doses adequadas estão na faixa de 0,01 -1,000 mg/kg. Algumas faixas típicas da dose são de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal ao dia. Em algumas modalidades, a faixa da dose varia de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal ao dia. Em algumas modalidades, a dose pode ser, por exemplo, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg ou 100 mg/kg. A dose provavelmente dependerá de variáveis tais como o tipo e o grau de progressão da doença ou transtorno, a situação global de saúde do paciente específico, a eficácia biológica relativa do composto selecionado,

a formulação do excipiente e sua via de administração.

[0097] Doses eficazes podem ser extrapoladas a partir de curvas de dose-resposta derivadas de sistemas de teste *in vitro* ou em modelos animais. Por exemplo, a análise de efeitos sobre a entrada na célula de peptídeos de gliadina em ensaios celulares pode ser útil. As composições podem também ser analisadas quanto a efeitos sobre respostas de anticorpos, produções de citocinas e respostas de células T.

[0098] Prevê-se que haverá amplas variações na dose necessária em vista do espectro de sintomas associados com transtornos relacionados ao glúten, a variedade de alvos celulares e as eficiências diferentes de várias vias de administração. As variações nesses níveis de dose podem ser ajustadas utilizando rotinas empíricas padrão para otimização, bem como bem entendidas na técnica. As administrações podem ser únicas ou múltiplas (por exemplo, 2 ou 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150 ou mais vezes). O encapsulamento dos compostos em um veículo de liberação adequado (por exemplo, micropartículas poliméricas ou em dispositivos implantáveis) pode aumentar a eficiência da liberação.

[0099] A duração do tratamento com qualquer composição aqui provida pode ser qualquer extensão de tempo, de tão curta quanto apenas um dia a tão longa quanto o período inteiro de vida do hospedeiro (por exemplo, muitos anos). Por exemplo, uma composição pode ser administrada uma vez por semana (durante, por exemplo, 4 semanas a muitos meses ou anos); uma vez ao mês (por exemplo, três a doze meses ou por muitos anos); ou uma vez ao ano por um período de 5 anos, dez anos ou mais longo. Note-se também que a frequência de tratamento pode ser variável. Por exemplo, as composições da presente invenção podem ser administradas uma vez (ou duas, três vezes, etc.) ao dia, por semana, por mês ou por ano.

[00100] Qualquer método conhecido pelos técnicos no assunto pode ser

empregado para determinar se uma determinada resposta é induzida. Métodos clínicos capazes de avaliar o grau de um estado de doença específica podem ser utilizados para determinar se uma resposta é induzida. Por exemplo, um indivíduo pode ser monitorado quanto ao alívio sintomático, por exemplo, alívio da diarreia, dor abdominal, cólicas, distensão abdominal e capacidade para tolerar um desafio de glúten. Alternativa ou adicionalmente, marcadores séricos, técnicas de imagem, por exemplo, ultrassonografia, radiografia e métodos endoscópicos podem ser utilizados.

[00101] As composições podem também ser administradas em conjunto com outras modalidades terapêuticas. Essas modalidades terapêuticas variarão de acordo com o transtorno específico, porém podem incluir, por exemplo, medidas dietéticas, como uma dieta livre de glúten. Em algumas modalidades, as medidas dietéticas podem incluir a introdução de produtos à base de trigo de linhagens que tenham sido construídas por beneficiamento genético seletivo ou tecnologias recombinantes para expressar formas de gliadina que tenham números reduzidos de epítomos tóxicos de células T. Em algumas modalidades, uma medida dietética pode incluir um prebiótico, ou seja, um agente que estimula o crescimento ou a atividade de uma ou mais espécies da flora intestinal flora que trazem benefícios à saúde do hospedeiro. Os prebióticos exemplares incluem trans-galacto-oligossacarídeo, inulina, fruto-oligossacarídeo e lactulose.

[00102] Outras modalidades terapêuticas incluem a administração de um agente terapêutico. Um agente terapêutico pode ser uma enzima, por exemplo, uma endopeptidase (também designada glutenase) que degrada o glúten, ao se direcionar contra os peptídeos ricos em prolina que do contrário resistiriam às proteases naturais do corpo, e que contém peptídeos altamente imunogênicos. As endopeptidases exemplares incluem prolil endopeptidases e ALV003, uma combinação de uma cisteína endoprotease derivada de sementes de cevada em germinação e uma prolil endopeptidase do capsulado de *Sphingomonas*.

[00103] Outros agentes terapêuticos incluem inibidores a permeabilidade intestinal aumentada típica da doença celíaca, por exemplo, AT-1001 (larazotida) um octapeptídeo inibidor de permeabilidade paracelular que inibe o rearranjo do citoesqueleto induzida por gliadinas de células epiteliais intestinais, a desmontagem de junções oclusivas e o incremento no pico de actina F. Outros agentes terapêuticos incluem inibidores de tTG, moduladores do sistema imune e terapia de dessensibilização com vacinas à base de peptídeos (Nevvax2).

[00104] A administração concomitante de dois ou mais agentes terapêuticos não requer que os agentes sejam administrados ao mesmo tempo ou pela mesma via, desde que exista uma sobreposição no período de tempo durante o qual os agentes exercem seus efeitos terapêuticos. A administração simultânea ou sequencial é contemplada, da mesma forma que a administração em diferentes dias ou semanas.

ARTIGOS MANUFATURADOS

As composições aqui descritas podem ser montadas em kits, junto com instruções para o uso. Por exemplo, os kits podem incluir quantidades medidas de uma composição incluindo um ou mais produtos alimentares fermentados com *L. paracasei* CBA L74. As instruções para uso podem ser transmitidas por qualquer meio adequado. Por exemplo, estas podem ser impressas em um folheto incluso em um ou mais idiomas ou fornecidas de forma audível ou visual (por exemplo, em um disco compacto). Os materiais para embalar podem incluir materiais de embalagem, por exemplo, frascos-ampolas, pacotes, recipientes. Em algumas modalidades, os kits podem incluir quantidades medidas de uma composição compreendendo *L. paracasei* CBA L74 em um veículo fisiologicamente aceitável, juntamente com materiais de embalagem e instruções para uso em qualquer um dos formatos descritos acima. Em algumas modalidades, os kits podem incluir quantidades medidas de uma composição compreendendo um ou mais metabólitos de *L. paracasei* CBA L74. Em algumas modalidades, as composições podem excluir células de *L. paracasei* CBA L74, ou

seja, os metabólitos podem ser parcial ou substancialmente separados das células de *L. paracasei* CBA L74. Os componentes do kit podem ser adequados para uso imediato. A invenção abrange kits, no entanto, que incluem formulações concentradas e/ou materiais que podem necessitar diluição antes do uso.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Materiais e métodos

[00105] Peptídeos: P31-P43 (SEQ ID NO.: 1) e P57-68 (SEQ ID NO.: 2) de α -gliadina foram sintetizados *in vitro* e ligados ao fluorocromo, lissamina, pela Inbios, Nápoles, Itália. As análises cromatográficas indicam que os peptídeos eram 99% puros.

[00106] Ensaio de entrada de peptídeos em CaCo2: Culturas de células CaCo2, uma linhagem celular de carcinoma epitelial de cólon humano, foram incubadas com os peptídeos marcados durante 15 minutos. Os peptídeos marcados foram removidos por lavagem repetida, e as células foram examinadas sob um microscópio confocal. A análise morfológica mostrou que, depois de 15 minutos de incubação, os peptídeos marcados haviam entrado nas células e se localizado em vesículas endocíticas, as quais apareceram como pequenos pontos coloridos. Realizou-se a análise quantitativa utilizando um pacote de software dedicado que avaliava a intensidade de fluorescência de múltiplos campos microscópicos.

[00107] Cultura de células CaCo2: As células CaCo-2 foram cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO, San Giuliano Milanese, Itália), soro bovino fetal 10% (FBS) (GIBCO, San Giuliano Milanese, Itália) e glutamina 1 mM (GIBCO, San Giuliano Milanese, Itália), em uma incubadora a uma temperatura de 37 °C e concentração de CO₂ de 5%.

[00108] Cultura de *L. paracasei* CBA L74: *L. Paracasei* CBA L74 (Número de Acesso do Depositário Internacional LMG P-24778) foi isolado como descrito em WO 2012/177556, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência

neste pedido de patente. As células foram cultivadas em 50 ml de DMEM suplementado com FBS e Glu, durante a noite a 37 °C e 160 oscilações por minutos. A concentração bacteriana foi medida por espectrofotometria em um espectrofotômetro Beckman DU-7, a um comprimento de onda de 600 nm. A leitura da Densidade Óptica (OD) foi usada para calcular a concentração bacteriana como segue: $OD\ 2 = 1,5 \times 10^9$ cfu/ ml. As diferentes concentrações bacterianas usadas para os experimentos foram obtidas diluindo a cultura bacteriana em meio fresco sem antibiótico. Para os experimentos usando apenas o sobrenadante, a cultura bacteriana foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi recuperado e passado através de um filtro com tamanho de poro de 0,2 micra.

[00109] Peptídeos de gliadina e EGF-Alexa-488: Peptídeos sintéticos (Inbios, 95% de pureza, análise MALDI-toff, como previsto) foram obtidos por filtração em Ultrasart-D20 (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha). O peptídeo P31-43 tinha a sequência de aminoácidos: LGQQQPFPPQQPY (SEQ ID NO.: 1). O peptídeo P57-68 tinha a sequência de aminoácidos: QLQPFPPQQLPY (SEQ ID NO.: 1). Os peptídeos foram conjugados com lissamina, um fluorocromo vermelho excitado por laser HeNe1 (543 nm) com emissão de banda *Long* de 610 nm. EGF-Alexa-488 foi obtido da Molecular Probes, San Giuliano Milanese, Itália.

[00110] Ensaio de fluorescência: Testou-se o efeito de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de peptídeos de gliadina ou de EGF-Alexa em células Caco-2. As células CaCo2 foram cultivadas em lamínulas estéreis de vidro, transferidas para placas de 24 poços e tratadas com concentrações diferentes de *L. paracasei* CBA L74, em uma faixa de 10^4 a 10^8 cfu/ml. Para experimentos usando o sobrenadante livre de células, as células CaCo2 foram tratadas com sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, coletado de culturas de *L. paracasei* CBA L74 que haviam atingido uma densidade de 10^8 cfu/ml. O sobrenadante foi usado fresco ou depois da exposição ao calor. Em alguns experimentos, o sobrenadante foi aquecido a 80 °C por 15 minutos.

Em outros experimentos, o sobrenadante foi fervido por 5 minutos. As células CaCo2 foram tratadas com os diferentes preparados bacterianos em atmosfera de CO₂ 5% e 37 °C, por 30 minutos, e depois incubadas com os peptídeos de gliadina P31-43-lissamina (liss) ou P57-68^{liss} ou com EGF-Alexa-488. As concentrações dos peptídeos foram como segue: P31-43^{liss} e P57-68^{liss} a 20 microgramas/ml; peptídeos não marcados foram usados a 50 microgramas/ml; EGF-Alexa-488 a 10 microgramas/ml. Depois da adição dos peptídeos, as células foram incubadas em atmosfera de CO₂ 5% a 37 °C por 30 minutos. O meio foi então removido por três lavagens com PBS 1X (Gibco). As lamínulas foram rapidamente (5 minutos) fixadas com paraformaldeído 3% (Sigma-Aldrich) à temperatura ambiente, depois montadas e observadas por microscopia confocal (LSM 510 Zeiss). Imagens foram geradas e analisadas com o *software* AIS Zeiss para avaliar a intensidade de fluorescência do campo magnético em consideração. A ampliação dos micrográficos foi igual para as figuras mostradas (objetiva 63x). Os peptídeos marcados e EGF-Alexa apareceram em vesículas de endocitose que aparecem como pequenos pontos coloridos em vermelho (peptídeos) ou em verde (EGF).

[00111] Análise estatística: A análise estatística e os gráficos foram obtidos com GraphPad Prism. A média e desvios padrões foram calculados. Estes foram avaliados pelo teste t de Student. Resultados com valores de p <0,05 foram considerados significantes.

Exemplo 2: Efeito de *L. paracasei* CBA L74 vivo sobre a entrada de peptídeos de α-gliadina

[00112] *L. paracasei* CBA L74 vivo reduziu a entrada de P31-43 e P57-68 em células CaCo2. Imagens de fluorescência confocal são mostradas na Figura 1. Células controle (painéis à esquerda) que foram incubadas com P31-43 marcado com lissamina, na ausência de *L. paracasei* CBA L74, mostraram padrões distintos de fluorescência que correspondiam a vesículas endocíticas contendo P31-43 (setas

brancas). Em contraste, a fluorescência era menor em células que foram incubadas com P31-43 marcado com lissamina na presença de *L. paracasei* CBA L74 (painéis à direita).

[00113] A análise quantitativa indicou que o efeito de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de P31-43 era dose-dependente e estatisticamente significativa. A Figura 2 mostra os resultados de cinco experimentos independentes em amostras duplicadas. A intensidade de fluorescência foi calculada para 30 campos aleatórios em cada amostra. Conforme mostrado na Figura 2, o tratamento de células CaCo2 com 10^4 , 10^6 e 10^8 *L. paracasei* CBA L74 resultou em uma redução estatisticamente significativa, dose-dependente na entrada de P31-43.

[00114] Um efeito similar foi observado para o peptídeo P57-68. O experimento mostrado na Figura 3 foi realizado exatamente como o experimento da Figura 2, exceto que P57-68 foi usado em lugar de P31-43. Conforme mostrado na Figura 3, o tratamento de células CaCo2 com 10^4 , 10^6 e 10^8 *L. paracasei* CBA L74 resultou em uma redução estatisticamente significativa, dose-dependente na entrada de P57-68.

Exemplo 3: Efeito do DNA isolado de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de peptídeos de α -gliadina

[00115] O DNA de *L. paracasei* CBA L74 foi extraído e purificado por métodos padrão. Conforme mostrado na Figura 4, o tratamento de células CaCo2 com P31-43 na presença de uma quantidade de DNA de *L. paracasei* CBA L74, equivalente àquele de 10^8 células, não bloqueou a entrada do peptídeo.

Exemplo 4: Efeito de sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de peptídeos de α -gliadina

[00116] O sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 foi coletado por centrifugação, e o sobrenadante da cultura foi filtrado para remover bactérias vivas e resíduos celulares. O sobrenadante do equivalente a 10^8 células foi aplicado a células

CaCo2 na presença do peptídeo P31-43. Células CaCo2 controle foram tratadas com 10^8 células de *L. paracasei* CBA L74 vivo. A Figura 5 mostra os resultados de quatro experimentos independentes em amostras duplicadas. A intensidade de fluorescência foi calculada para 30 campos aleatórios em cada amostra.

[00117] Conforme retratado no gráfico de barras da Figura 5a, o tratamento de células CaCo2 com células de *L. paracasei* CBA L74 vivo mais uma vez resultou em uma redução estatisticamente significativa na entrada do peptídeo P31-43. O tratamento de células CaCo2 com o sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 resultou em uma redução de magnitude similar. Imagens confocais para este experimento são apresentadas na Figura 5b. Essas imagens mostram claramente que o sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 reduziu a entrada do peptídeo P31-43.

[00118] Os resultados de um experimento similar no qual P57-68 foi substituído por P31-43 são mostrados na Figura 6. O tratamento de células CaCo2 com células de *L. paracasei* CBA L74 vivo mais uma vez resultou em uma redução estatisticamente significativa na entrada do peptídeo P57-68 (Figura 6a). O tratamento de células CaCo2 com um sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 resultou em uma redução de magnitude similar. Imagens confocais para este experimento são apresentadas na Figura 6b. Essas imagens mostram claramente que o sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 reduziu a entrada do peptídeo P57-68.

Exemplo 5: Efeito de sobrenadante tratado com calor da cultura de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de peptídeos de α -gliadina

[00119] O sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 foi coletado de acordo com o método do Exemplo 4 e depois foi aquecido por 30 minutos a 37 ° ou a 80 °C por 30 minutos. Os sobrenadantes aquecidos foram então resfriados e aplicados a células CaCo2 na presença de P31-43. A Figura 7 mostra os resultados de cinco experimentos independentes em amostras duplicadas para células controle que não

foram tratadas com sobrenadante; cinco experimentos independentes em amostras duplicadas para células controle tratadas com sobrenadante não aquecido ("37 °C") e dois experimentos independentes em amostras duplicadas para células que haviam sido tratadas com sobrenadante aquecido ("80 °C"). A intensidade de fluorescência foi calculada para 30 campos aleatórios em cada amostra. Conforme mostrado na Figura 7, o sobrenadante aquecido para 80°C reteve a capacidade do sobrenadante não aquecido para bloquear a entrada do peptídeo P31-43 em células CaCo2. Imagens confocais para esse experimento são apresentadas no painel à direita da Figura 7. Essas imagens mostram claramente que o sobrenadante tratado com calor da cultura de *L. paracasei* CBA L74 reduziu a entrada do peptídeo P31-43 na mesma medida feita pelo sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 não tratado com calor. Considerados em conjunto, esses dados sugerem que o efeito do sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 não resultava de atividade enzimática.

Exemplo 6: Efeito de arroz fermentado e de aveia fermentada por *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de peptídeos de α -gliadina

[00120] Preparou-se arroz fermentado por *L. paracasei* CBA L74. O arroz fermentado, o sobrenadante do arroz fermentado ou o sobrenadante tratado com calor do arroz fermentado foram aplicados a células CaCo2 na presença do peptídeo P31-43, e a entrada do peptídeo foi monitorada de acordo com o método do Exemplo 2. Conforme mostrado na Figura 8, todos os três tratamentos - arroz fermentado, sobrenadante do arroz fermentado ou sobrenadante tratado com calor do arroz fermentado - reduziram a entrada do peptídeo em relação a células CaCo2 não tratadas. Conforme mostrado na Figura 9, a redução na entrada do peptídeo P31-43 na presença de arroz fermentado foi estatisticamente significativa (barras do lado direito). Um efeito similar, estatisticamente significativo foi observado na presença de aveia fermentada (barras do lado esquerdo).

Exemplo 7: Efeito de arroz fermentado e de aveia fermentada por *L. paracasei*

CBA L74 sobre a entrada de Dextran-Texas Red em células CaCo2

[00121] Preparou-se arroz fermentado e aveia fermentada por *L. paracasei* CBA L74. Conforme mostrado na Figura 10, a incubação de células CaCo2 com arroz fermentado ou aveia fermentada resultou em uma redução estatisticamente significativa na entrada de células de Dextran-Texas Red em relação a células que haviam sido tratadas com arroz ou com aveia não fermentados, respectivamente. Considerando que Dextran é em geral captado por células via macropinocitose, esses dados sugeriram que metabólitos de *L. paracasei* CBA L74 são capazes de bloquear a via macropinocítica.

Exemplo 8: Efeito de sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de fator de crescimento epidérmico (EGF) em células CaCo2

[00122] O sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 foi coletado de acordo com o método do Exemplo 4 e aplicado a células CaCo2 na presença de EGF conjugado a Alexa Fluor® (Invitrogen). Conforme retratado no gráfico de barras da Figura 11, o tratamento de células CaCo2 com o sobrenadante da cultura de *L. paracasei* CBA L74 resultou em uma redução estatisticamente significativa na entrada celular de EGF. Imagens confocais para esse experimento são mostradas na Figura 12. Considerando que a captação de EGF requer ligação específica ao receptor, por exemplo, a um receptor de EGF, esses dados sugeriram que metabólitos de *L. paracasei* CBA L74 são capazes de bloquear a via endocítica mediada por clatrina.

Exemplo 9: Efeito dependente da concentração de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de P31-43 e P57-68 em células CaCo2

[00123] Células CaCo2 foram tratadas com concentrações crescentes de *L. Paracasei* CBA L74 e depois incubadas com os peptídeos de gliadina P31-43^{liss} ou P57-68^{liss} como descrito no Exemplo 1. Vesículas de endocitose que continham P31-43 marcado ou P57-68 marcado apareceram como pontos vermelhos com distribuição citosólica após 30 minutos de exposição. O tratamento com *L. paracasei* CBA L74

resultou em uma redução dose-dependente na entrada de P31-43 e de P57-68 em células CaCo2. Conforme mostrado nas Figuras 13b, 13c e 13d, para P31-43, o tratamento com 10^4 , 10^6 e 10^8 cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, resultou em uma redução da intensidade de fluorescência em relação àquela vista em células controle não tratadas (Figura 13a). As setas brancas indicam vesículas contendo P31-43^{liss}. Esses resultados são apresentados quantitativamente na Figura 14. A intensidade de fluorescência foi calculada para 30 campos aleatórios de cada amostra. Os dados na Figura 14 eram representativos de cinco experimentos independentes. O gráfico em barras na Figura 14 compara a intensidade de fluorescência de células controle não tratadas ("UN") com aquela de células que foram expostas a P31-43^{liss} na presença de 10^4 , 10^6 ou 10^8 cfu/ml de células de *L. paracasei* CBA L74. O tratamento com *L. paracasei* CBA L74 resultou em uma redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência de 50%, 70% e 75%, respectivamente para 10^4 , 10^6 ou 10^8 cfu/ml de células de *L. paracasei* CBA L74 (**=p<0,001).

[00124] Conforme mostrado nas Figuras 15b, 15c e 15d, para P57-68^{liss}, o tratamento com 10^4 , 10^6 e 10^8 cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, resultou em uma redução da intensidade de fluorescência em relação àquela vista em células controle não tratadas (Figura 15a). As setas brancas indicam vesículas contendo P57-68^{liss}. Esses resultados são apresentados quantitativamente na Figura 16. A intensidade de fluorescência foi calculada para 30 campos aleatórios de cada amostra. Os dados na Figura 16 eram representativos de cinco experimentos independentes. O gráfico em barras na Figura 16 compara a intensidade de fluorescência de células controle não tratadas ("UN") com aquela de células que foram expostas a P57-68^{liss} na presença de 10^4 , 10^6 ou 10^8 cfu/ml de células de *L. paracasei* CBA L74. O tratamento com *L. paracasei* CBA L74 resultou em uma redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência de 25%, 25% e 50%,

respectivamente, para 10^4 , 10^6 ou 10^8 cfu/ml de células de *L. paracasei* CBA L74. Conforme mostrado nas Figuras 15B, 15C e 15D, para P57-68, o tratamento com 10^4 , 10^6 e 10^8 cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74 resultou em uma redução da intensidade de fluorescência de 25%, 25% e 50%, respectivamente, em relação a células controle não tratadas (**= $p<0,001$).

[00125] Conforme mostrado na Figura 17, o tratamento com 10^8 cfu/ml de *L. paracasei* CBA L74 reduziu a intensidade de fluorescência em 75%, para P31-43, e em 50% para P57-68. Esses dados sugeriram que *L. paracasei* CBA L74 pode ser mais eficiente em reduzir a entrada de P41-43 do que em reduzir a entrada de P57-68, possivelmente refletindo vias endocíticas diferentes.

Exemplo 10: Efeito dependente da concentração de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de P31-43 e P57-68 em células CaCo2

[00126] Células CaCo2 foram tratadas com sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ou com DNA de *L. paracasei* CBA L74 como descrito no Exemplo 1. As células CaCo2 foram incubadas por 30 minutos em sobrenadante ou DNA do equivalente a 10^8 cfu/ml. Conforme mostrado nas Figuras 18b e 18c, o tratamento com células de *L. paracasei* CBA L74 ou sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, resultou em uma redução na intensidade de fluorescência em células expostas a P31-43^{liss}, em relação àquela vista em células controle não tratadas (Figura 18a). Esses resultados são apresentados quantitativamente na Figura 19. A intensidade de fluorescência foi calculada para 30 campos aleatórios de cada amostra. Os dados na Figura 19 eram representativos de cinco experimentos independentes. O gráfico em barras na Figura 19 compara a intensidade de fluorescência de células controle não tratadas ("UN") com aquela de células que foram expostas a P31-43^{liss} na presença de 10^8 cfu/ml de células de *L. paracasei* CBA L74 ("LP 10^8 ") ou o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 proveniente de uma cultura de *L. paracasei* CBA L74 a 10^8 cfu/ml ("Sup LP 10^8 "). Conforme mostrado na Figura 19,

o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 reduziu significativamente a entrada de P31-43 em células CaCo2, calculado como redução de intensidade de fluorescência, em aproximadamente 25% relativamente a células controle não tratadas (**= $p < 0,001$).

[00127] Conforme mostrado nas Figuras 20b e 20c, o tratamento com células de *L. paracasei* CBA L74 ou com sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, resultou em uma redução na intensidade de fluorescência em células expostas a P57-68^{hss}, em relação àquela vista em células controle não tratadas (Figura 20a). T Esses resultados são apresentados quantitativamente na Figura 21. O gráfico em barras na Figura 21 compara a intensidade de fluorescência de células controle não tratadas ("UN") com aquela de células que foram expostas a P57-68^{liss} na presença de 10^8 cfu/ml de células de *L. paracasei* CBA L74 ("LP 10^8 ") ou de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sup LP 10^8 ") proveniente de uma cultura de *L. paracasei* CBA L74 a 10^8 cfu/ml. Conforme mostrado na Figura 21, o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 reduziu significativamente a entrada de P31-43 em células CaCo2, calculado como redução de intensidade de fluorescência, em aproximadamente 40% relativamente a células controle não tratadas (**= $p < 0,001$).

[00128] Em contraste, o tratamento com DNA purificado de *L. paracasei* CBA L74 não teve efeito sobre a entrada de P31-43 ou P57-68 em células CaCo2. Considerados em conjunto, esses dados sugeriram que o metabólito, responsável por reduzir a entrada dos peptídeos, pode ter sido secretado no sobrenadante da cultura bacteriana.

Exemplo 11: Efeito de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de EGF-Alexa 488 em células CaCo2

[00129] Células CaCo2 foram tratadas com o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 proveniente de uma cultura de *L. paracasei* CBA L74 a 10^8 cfu/ml, seguido por incubação com EGF-Alexa 488 por 30 minutos como descrito no Exemplo 1. Conforme mostrado na Figura 22b, o tratamento com o sobrenadante de *L. paracasei*

CBA L74 resultou em uma redução na intensidade de fluorescência de células expostas a EGF-Alexa 488, em relação àquela vista em células controle não tratadas (Figura 22a). Esses resultados são apresentados quantitativamente na Figura 23. A intensidade de fluorescência foi calculada para 30 campos aleatórios de cada amostra. Os dados na Figura 23 eram representativos de cinco experimentos independentes. O gráfico em barras na Figura 23 compara a intensidade de fluorescência de células controle não tratadas ("UN") com aquela de células que foram expostas a EGF-Alexa 488 na presença do sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 sobrenadante ("Sup LP 10⁸"). Conforme mostrado na Figura 23, o *L. paracasei* CBA L74 reduziu significativamente a entrada de EGF-Alexa 488 em células CaCo2, calculada como redução de intensidade de fluorescência, em aproximadamente 50% relativamente a células controle não tratadas. A entrada de EGF-Alexa 488 pareceu ser bloqueada na membrana das células (**= $p < 0,001$).

Exemplo 12: Efeito de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 sobrenadante sobre a entrada de P31-43 em células CaCo2 após a remoção do sobrenadante

[00130] Células CaCo2 foram incubadas com o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 proveniente de uma cultura de *L. paracasei* CBA L74 a 10⁸ cfu/ml por 30 minutos como descrito no Exemplo 1. O sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 foi depois removido e substituído por DMEM. P31-43^{liss} foi adicionado e a entrada do peptídeo foi monitorada como descrito no Exemplo 1. Conforme se mostra na Figura 24c, a entrada de P31-43-liss foi reduzida significativamente, em relação a células controle não tratadas (Figura 24a) mesmo após o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ter sido removido e substituído por DMEM. A Figura 24b mostra células CaCo2 que haviam sido tratadas com sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que não havia sido removido. O gráfico em barras na Figura 25 compara a intensidade de fluorescência de células controle não tratadas ("UN"); células que foram expostas a P31-43-liss na presença do sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sup LP 10⁸") e

células que foram expostas a P31-43-liss após a remoção do sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("MEM") (**= $p<0,001$).

Exemplo 13: Efeito de sobrenadante tratado com calor de *L. paracasei* CBA L74 sobre a entrada de P31-43 em células CaCo2

[00131] Células CaCo2 foram incubadas com sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 (proveniente de uma cultura de *L. paracasei* CBA L74 a 10^8 cfu/ml) que havia sido tratado por ebulição durante 5 minutos ou por incubação a 80 °C por 15 minutos. A entrada de P31-43-liss foi analisada como descrito no Exemplo 1. Como se mostra na Figura 26d, a entrada de P31-43-liss foi reduzida, em relação a células controle não tratadas (Figura 24a) mesmo depois de se aquecer o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 para 80 °C. Em contraste, a entrada de P31-43-liss não reduziu significativamente (Figura 26c), em relação a células controle não tratadas (Figura 24a) quando o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 havia sido aquecido a 95 °C - 100 °C. A Figura 26b mostra células CaCo2 que haviam sido tratadas com sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que não havia sido tratado. O gráfico em barras na Figura 27 compara a intensidade de fluorescência de células controle não tratadas ("UN"); células que foram expostas a P31-43-liss na presença de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sup LP 10^8 ") que não havia sido tratado com calor; células que foram expostas a P31-43-liss na presença de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que havia sido fervido ("95°-100°"); e células que foram expostas a P31-43-liss na presença de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 sobrenadante que havia sido aquecido a 80 °C ("70°- 80°"). Considerados em conjunto, esses dados sugeriram que o efector biológico no sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 pode não ser uma enzima, pois a atividade enzimática é tipicamente destruída por temperaturas de 80 °C (**= $p<0,001$).

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acesso do Depositário Internacional LMG P-24778, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a preparação de uma composição para tratar doença celíaca, reduzindo um sintoma de toxicidade de peptídeos de gliadina em um indivíduo tendo doença celíaca ao fornecer uma barreira aumentada para a translocação de um peptídeo de gliadina através de uma mucosa intestinal do indivíduo.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição é substancialmente livre de células de *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acesso do Depositário Internacional LMG P-24778.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo de gliadina é um peptídeo de α -gliadina.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo de α -gliadina tem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em LGQQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 1); QLQPFPPQLPY (SEQ ID NO: 2); LGQQQPFPPQQPYQPQPF (SEQ ID NO: 3); e LQLQPFPPQLPYQPQLPYPQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 4).

5. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição compreende um produto alimentício.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição compreende um veículo farmacêutico.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição é uma cultura de células de *Lactobacillus paracasei* CBA L74 viva ou não-replicante, Número de Acesso do Depositário Internacional LMG P-24778.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células da cultura não-replicante de *Lactobacillus paracasei* CBA L74 são mortas, Número de Acesso do Depositário Internacional LMG P-24778.

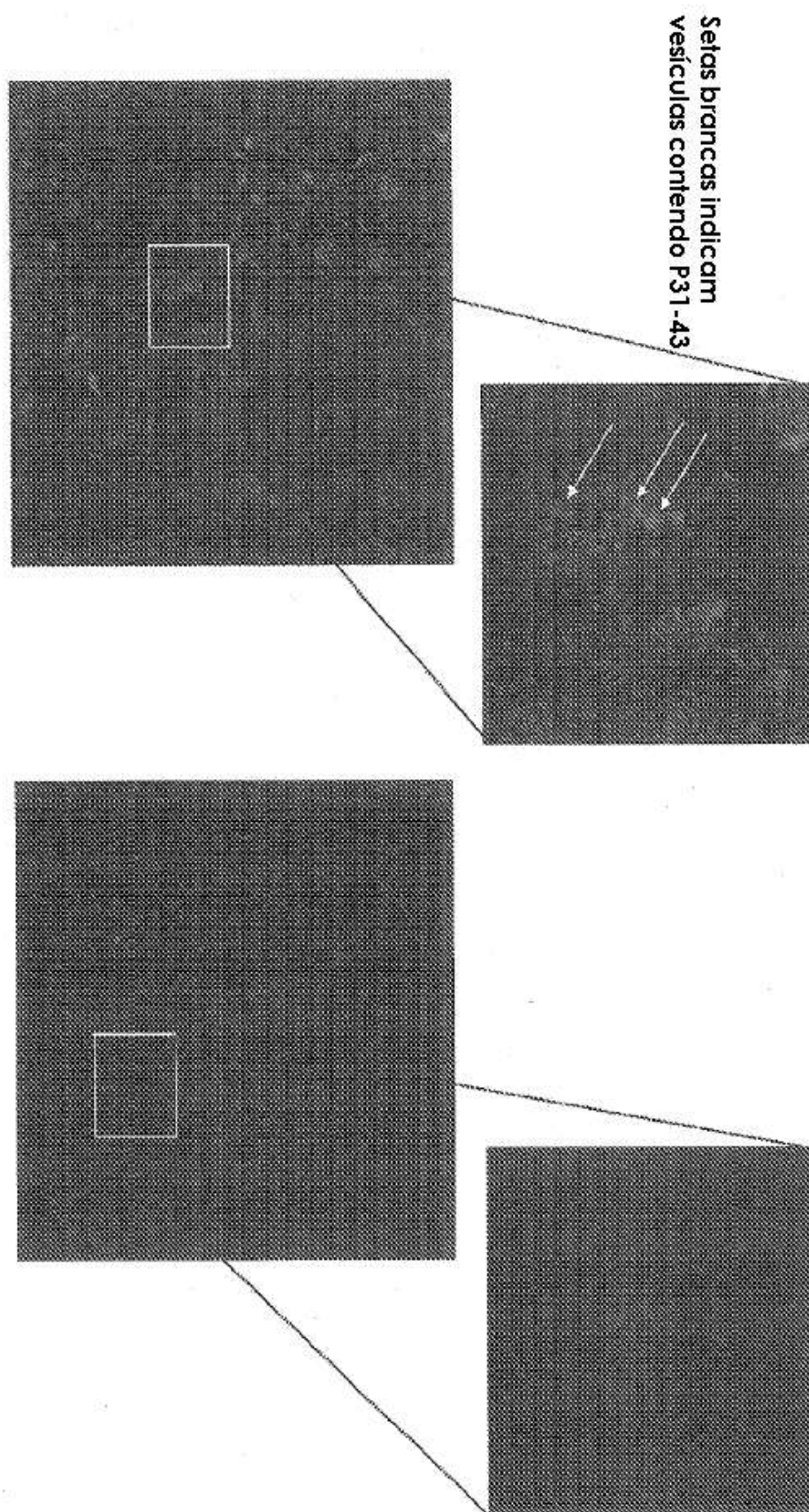


FIGURA 1

Intensidade de fluorescência/ 30 campos aleatórios

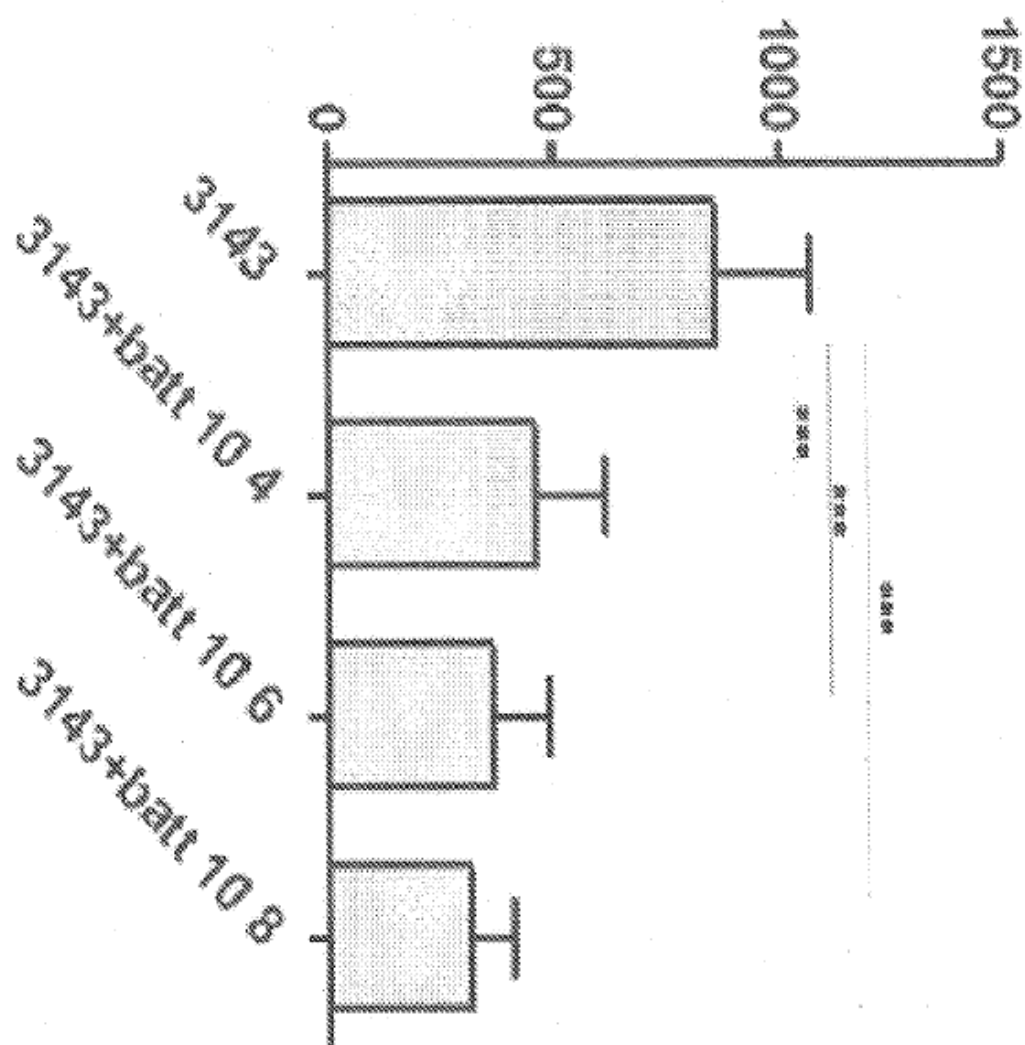


FIGURA 2

Intensidade de fluorescência/ 30 campos aleatórios

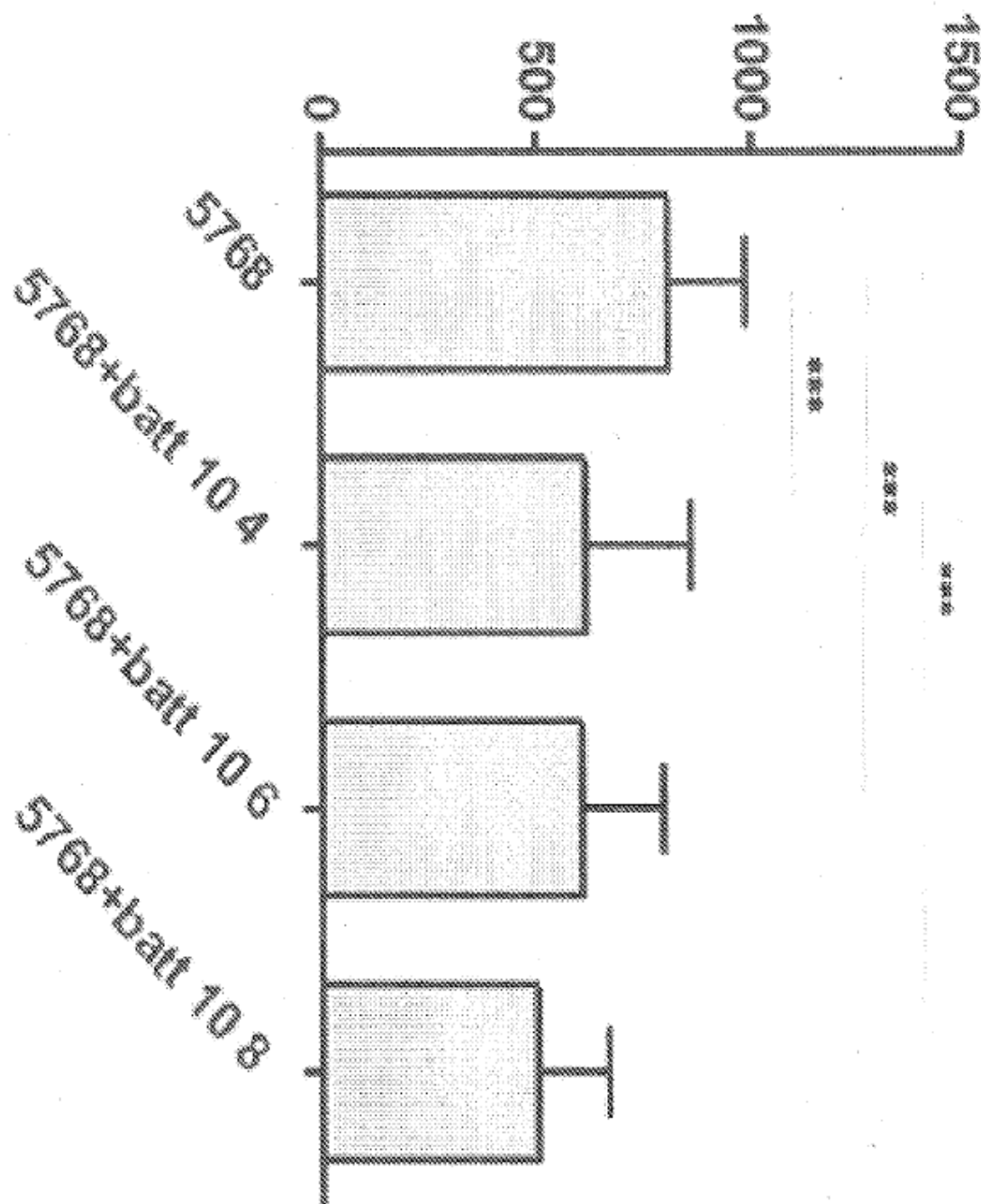
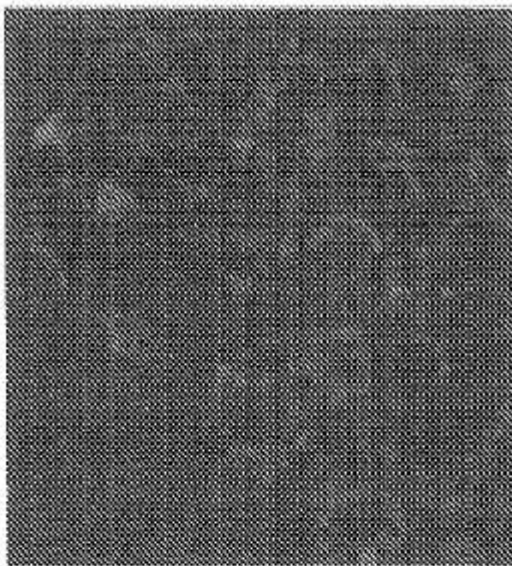


FIGURA 3

Não tratadas



DNA de 10^8 bactérias

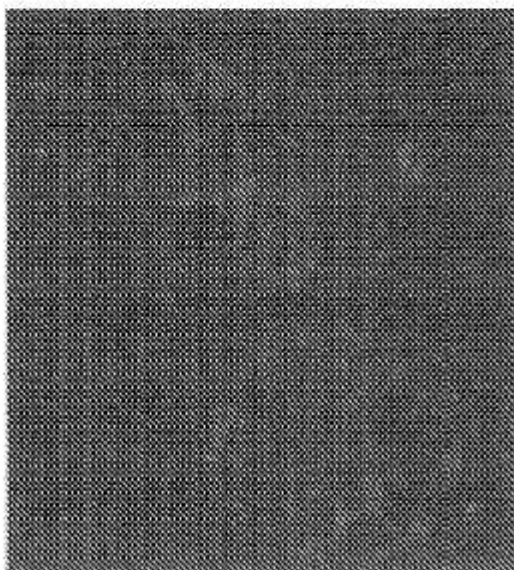


FIGURA 4

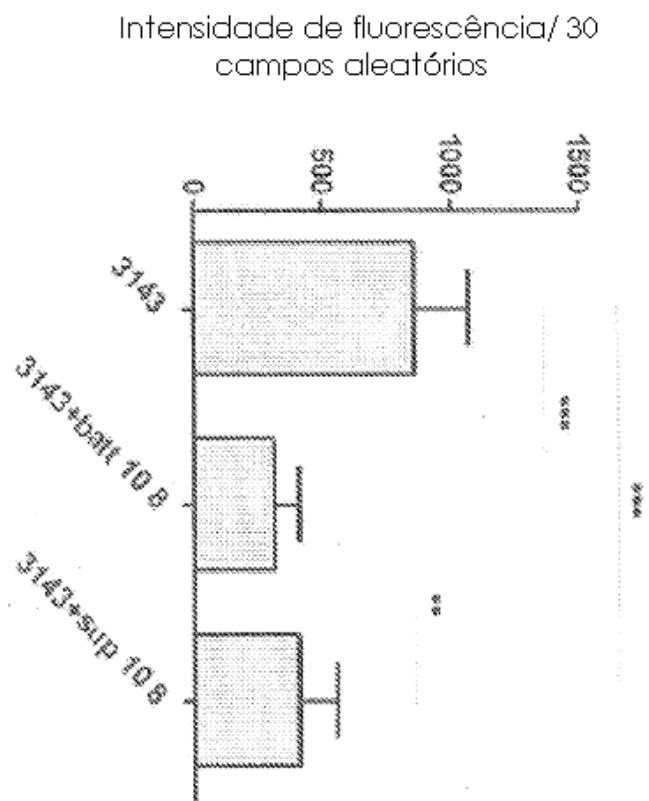


FIGURA 5a

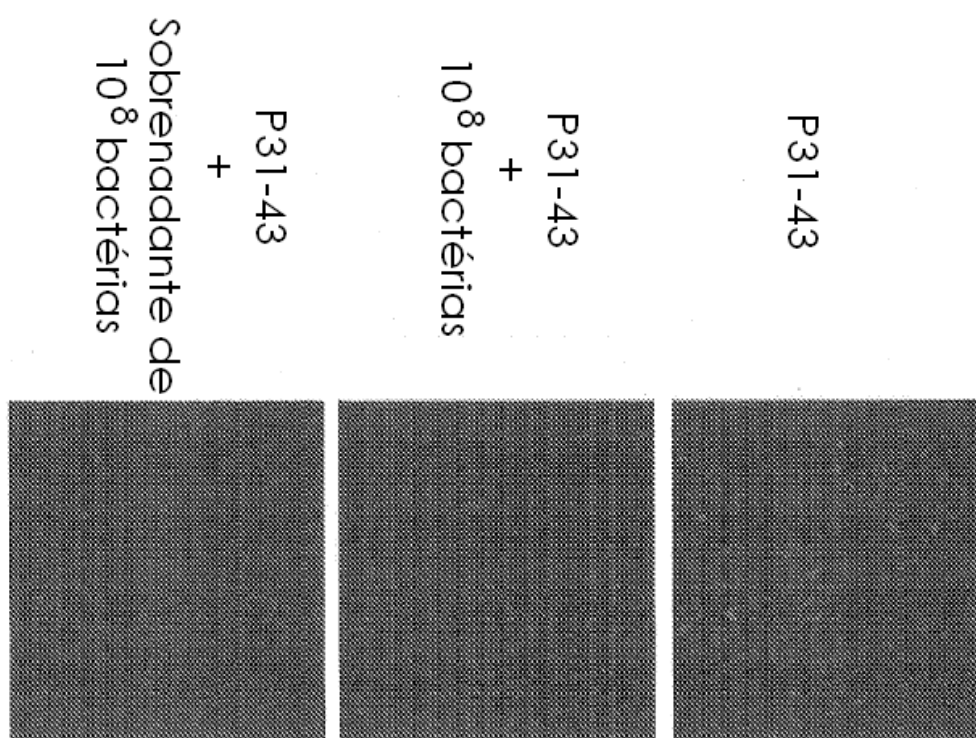


FIGURA 5b

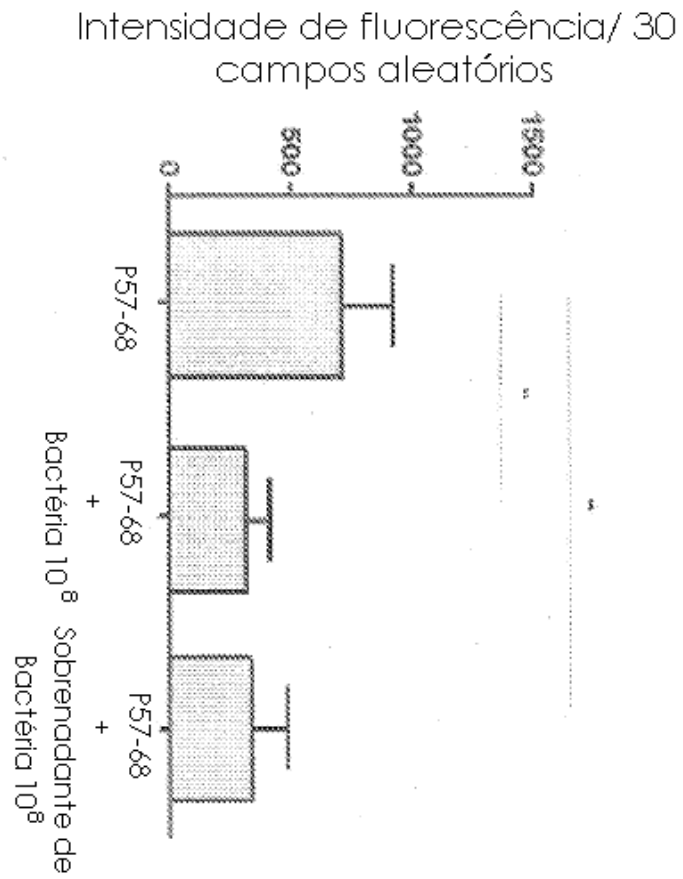


FIGURA 6a

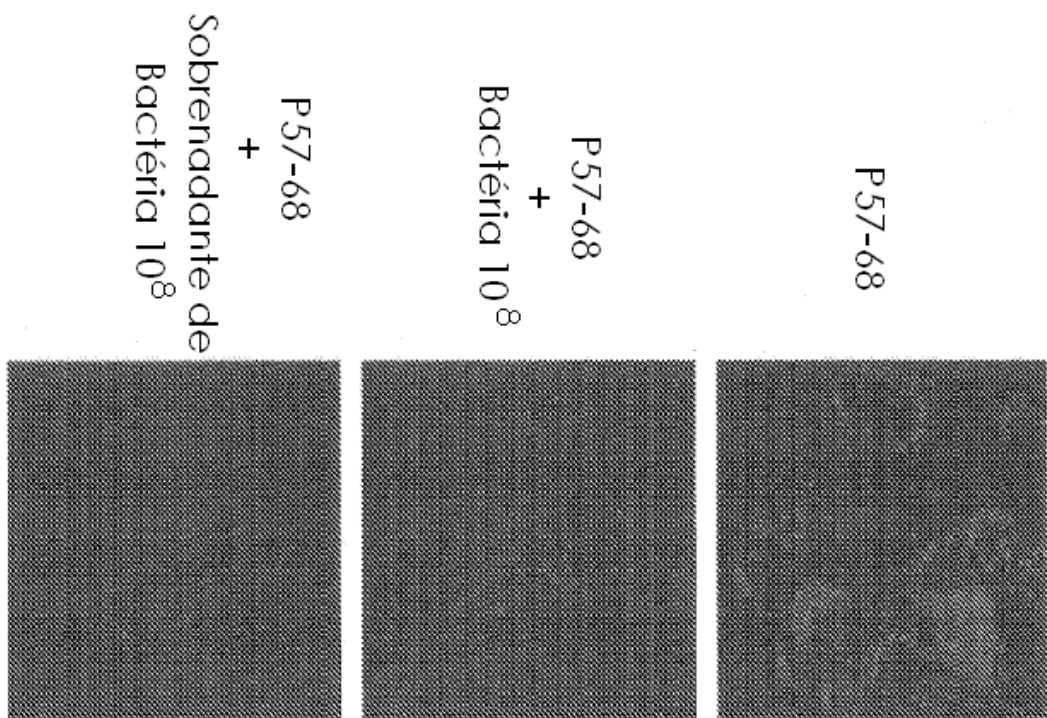


FIGURA 6b

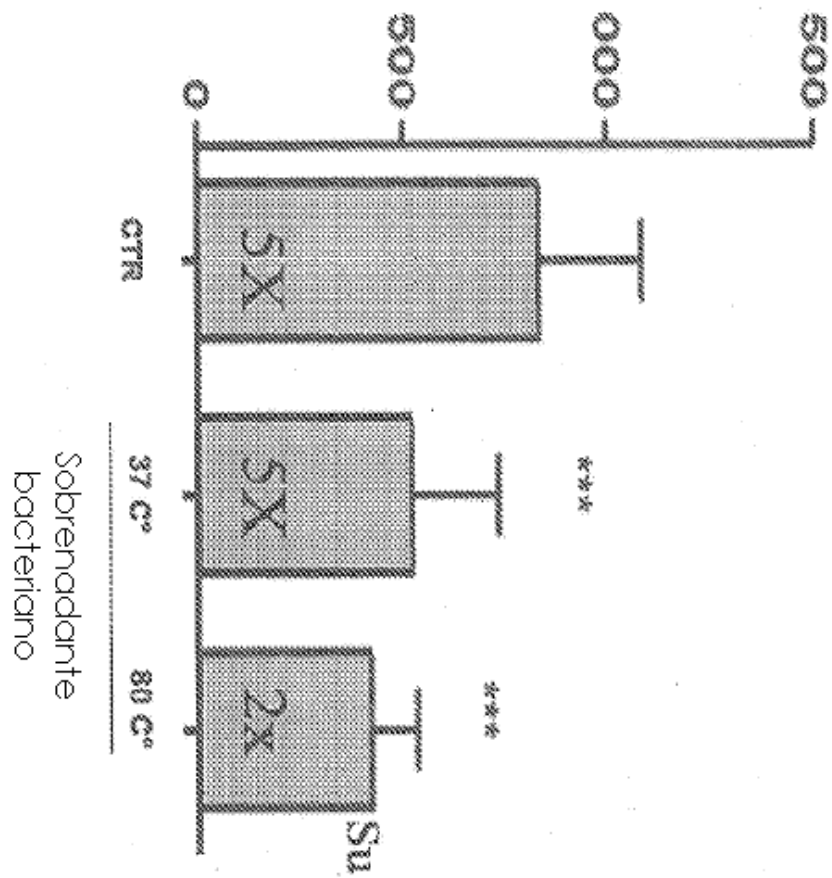


FIGURA 7a

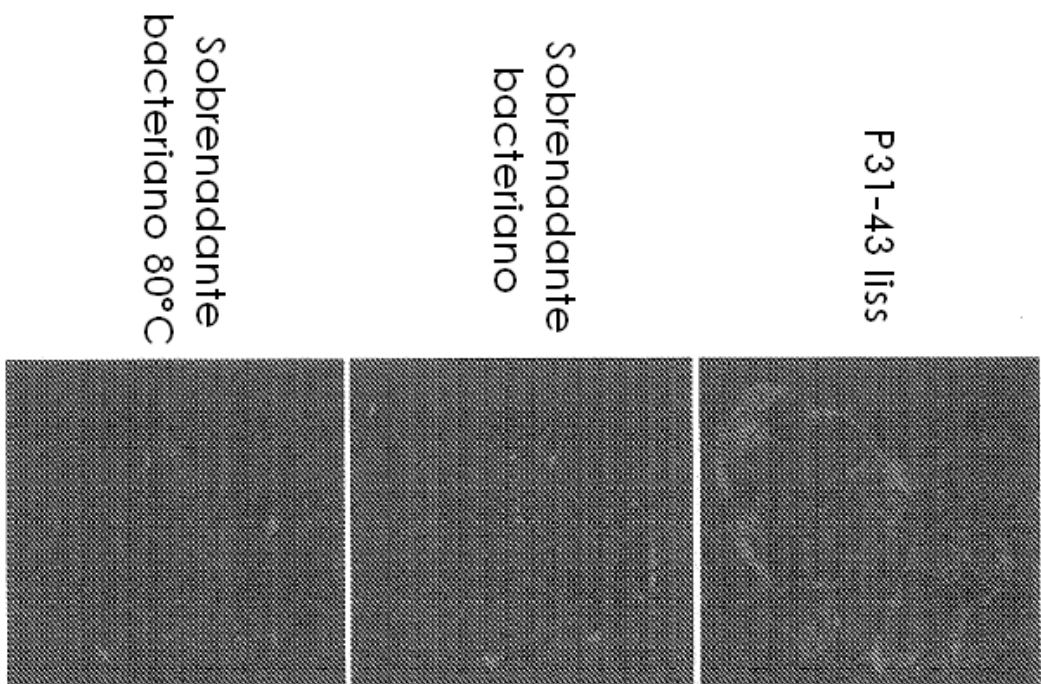
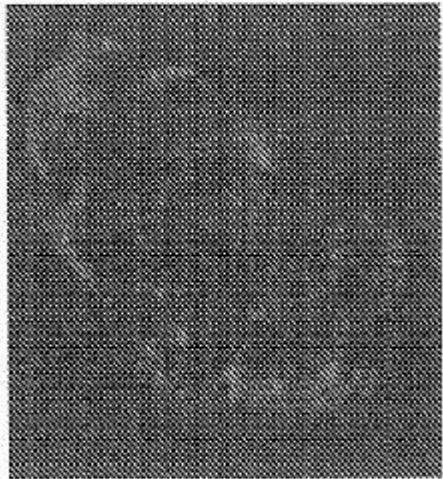


FIGURA 7b

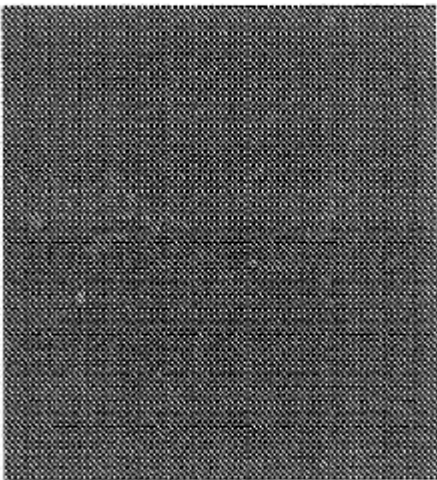
P31-43 liss



Fermentado



Sobrenadante
de fermentado



Sobrenadante de
fermentado 80°C

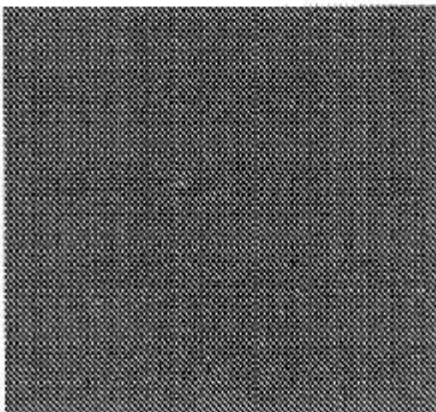


FIGURA8

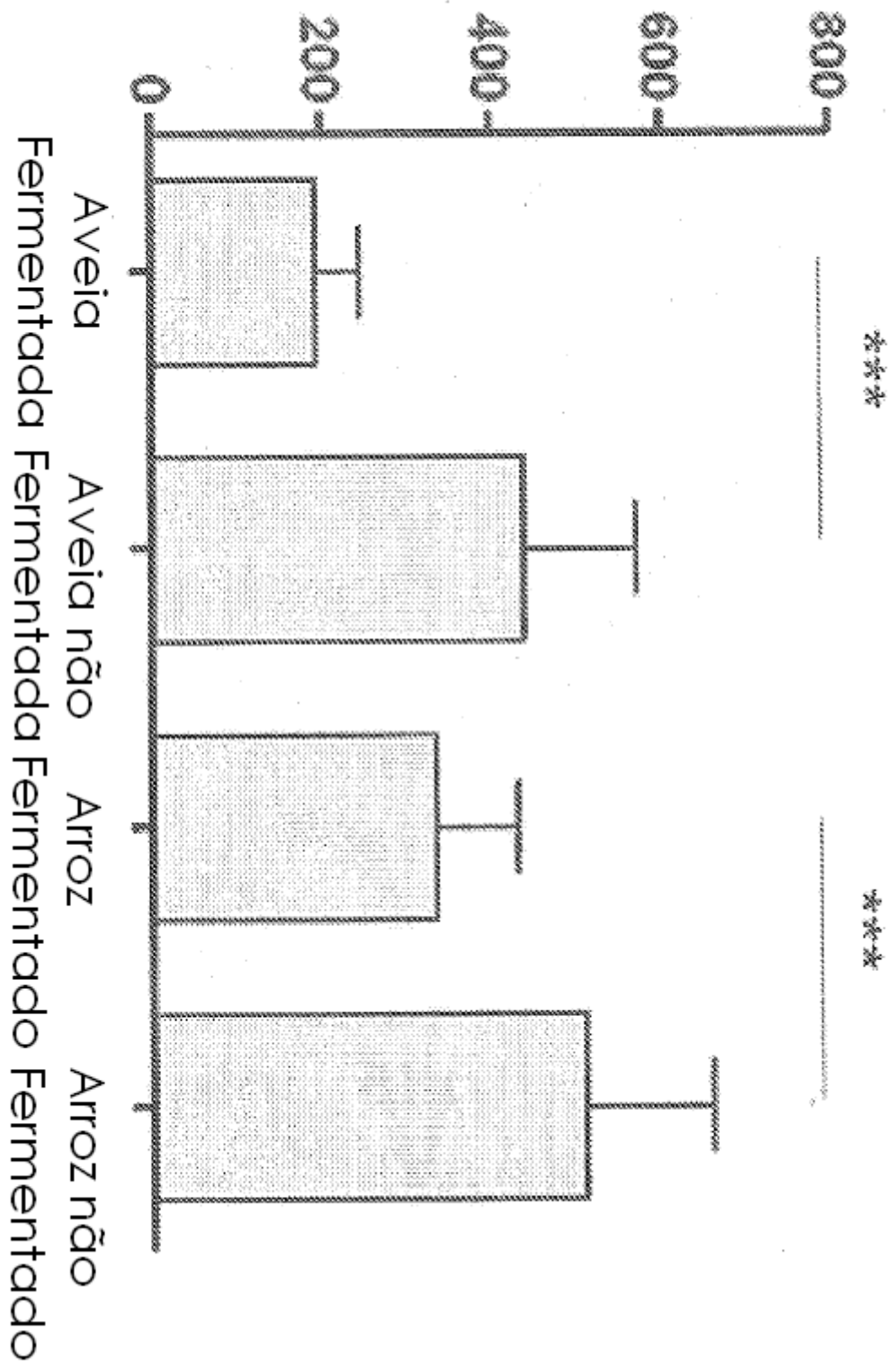


FIGURA 9

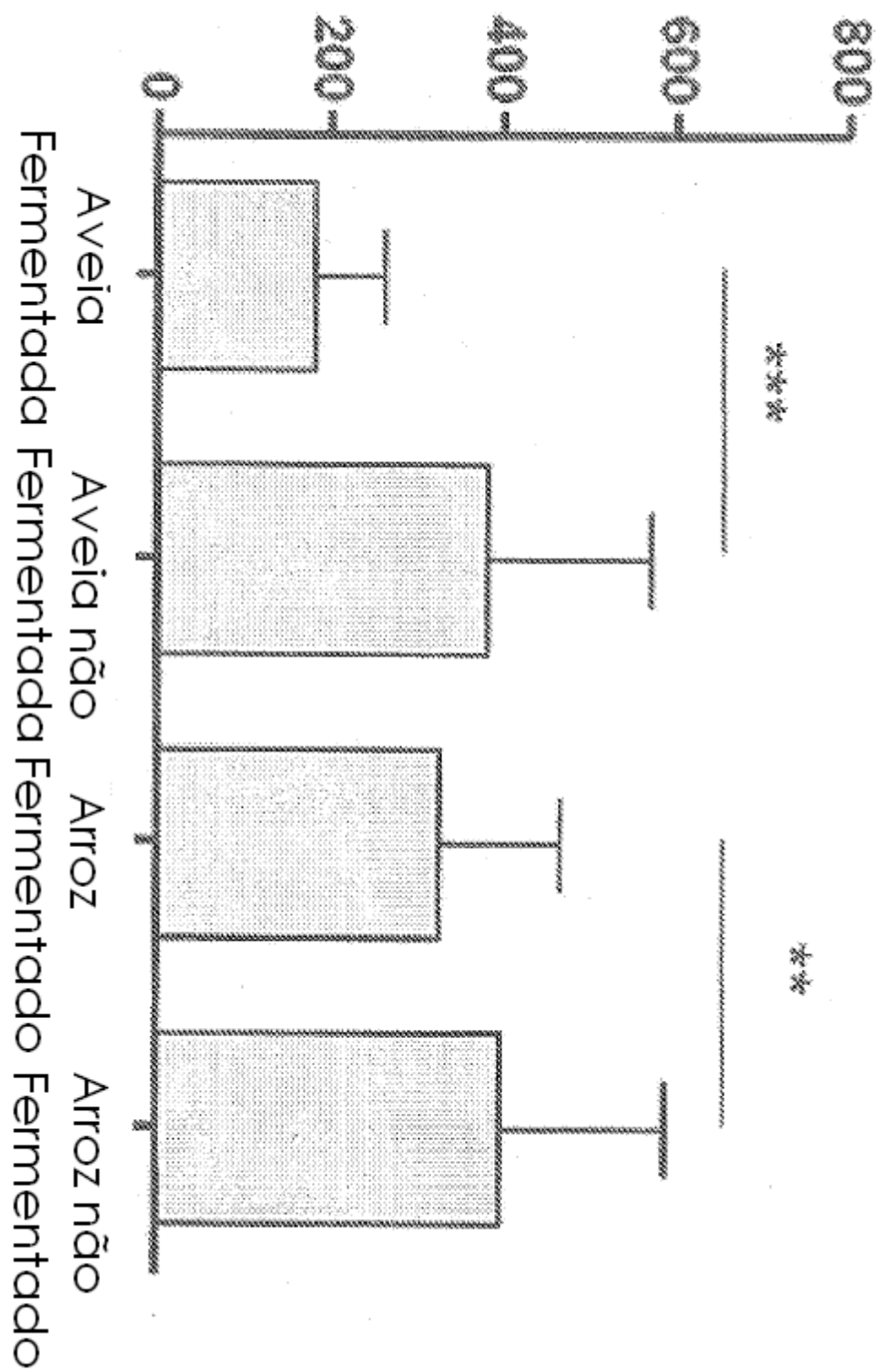


FIGURA 10

Intensidade de fluorescência/ 30 campos aleatórios

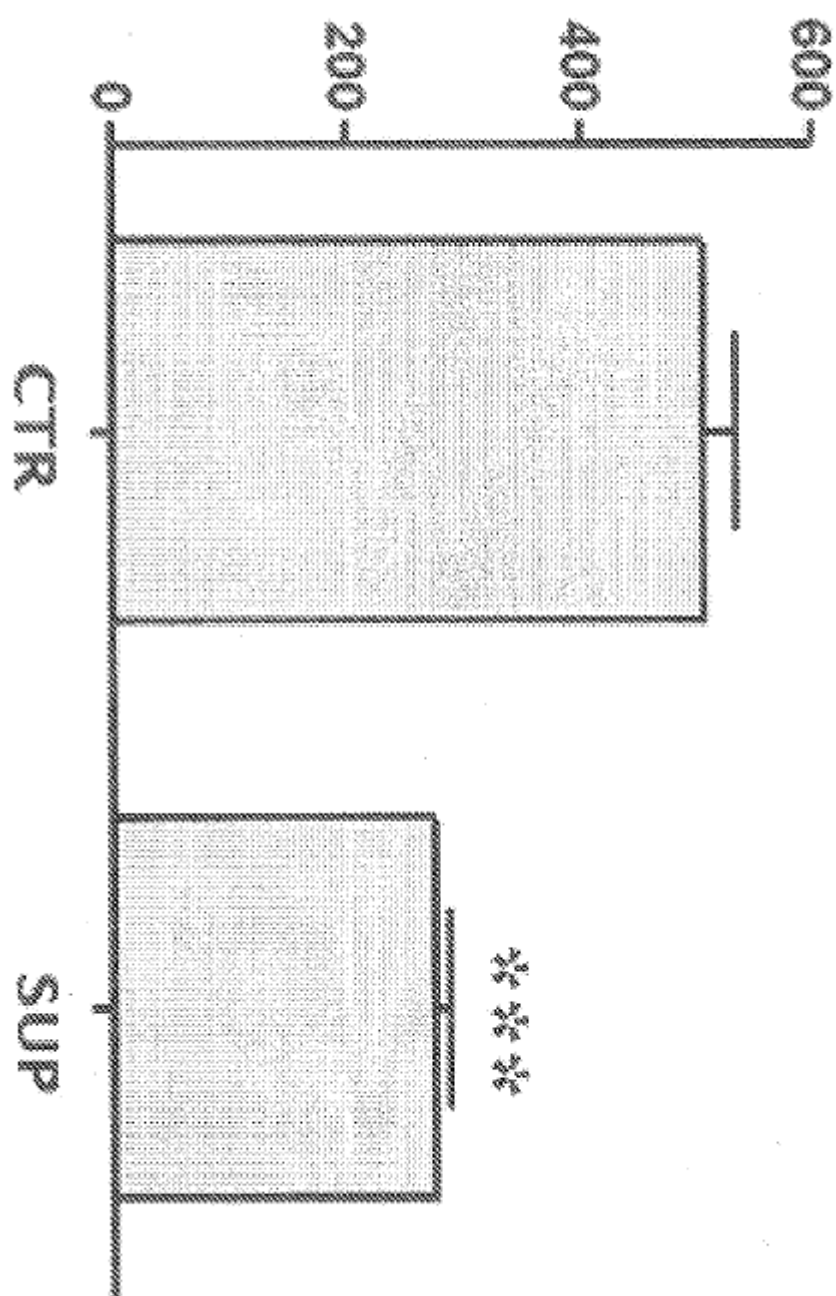
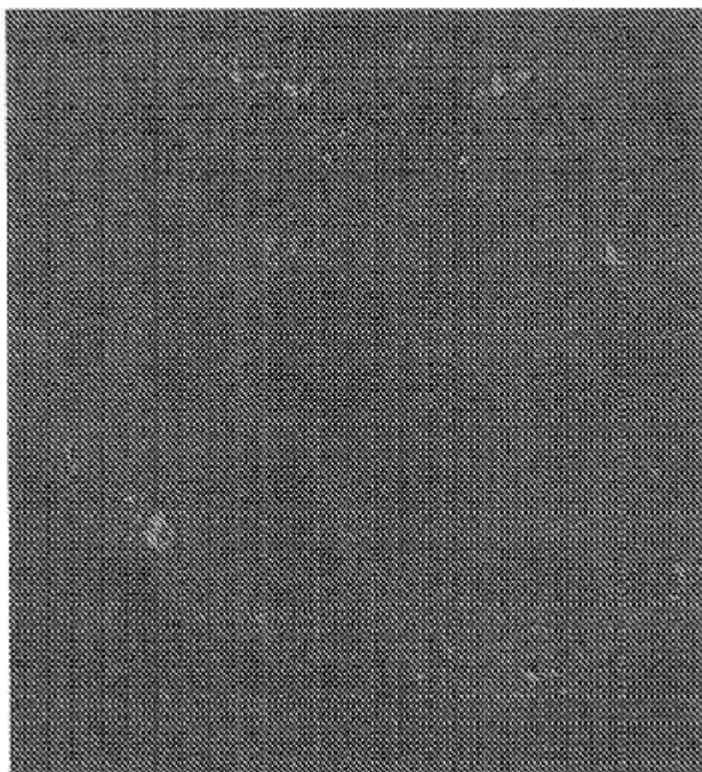


FIGURA 11

CTR



SUP

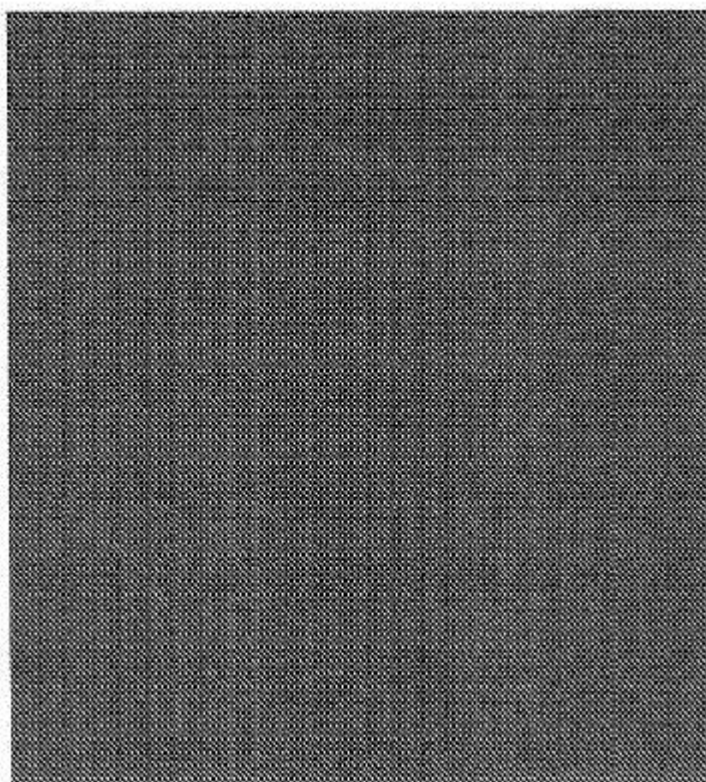


FIGURA 12

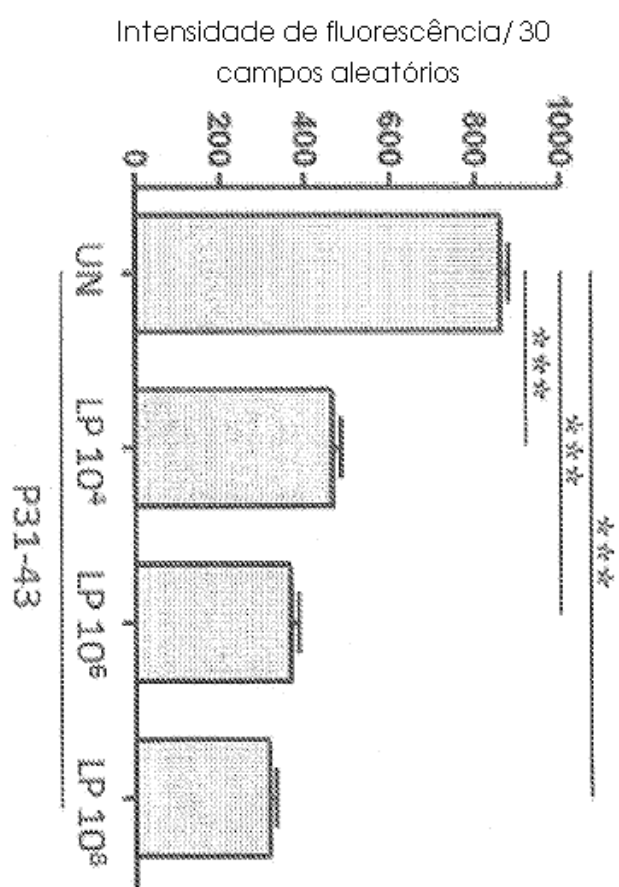


FIGURA 14

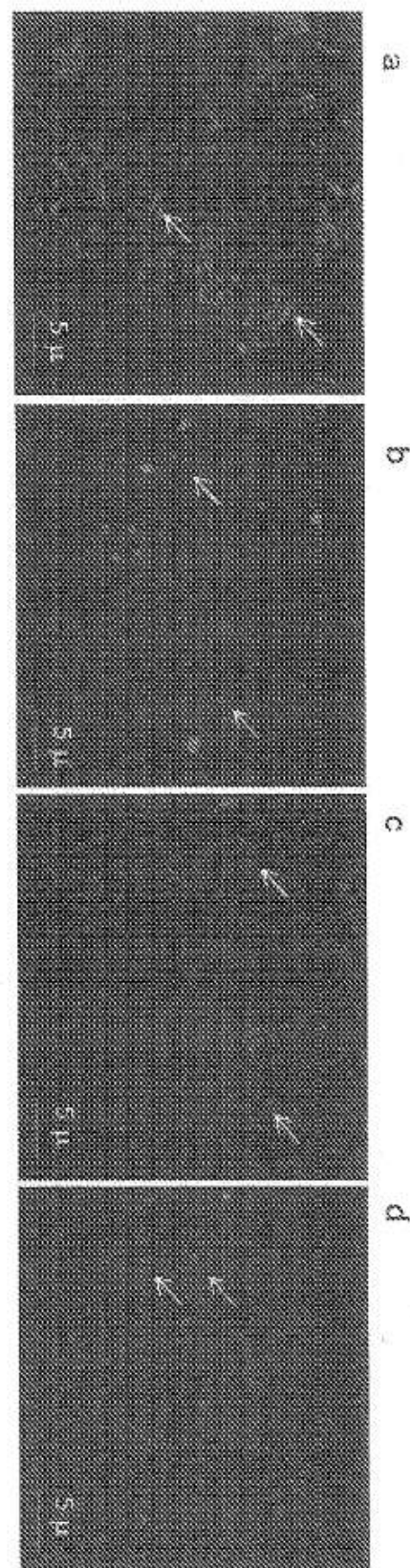


FIGURA 13

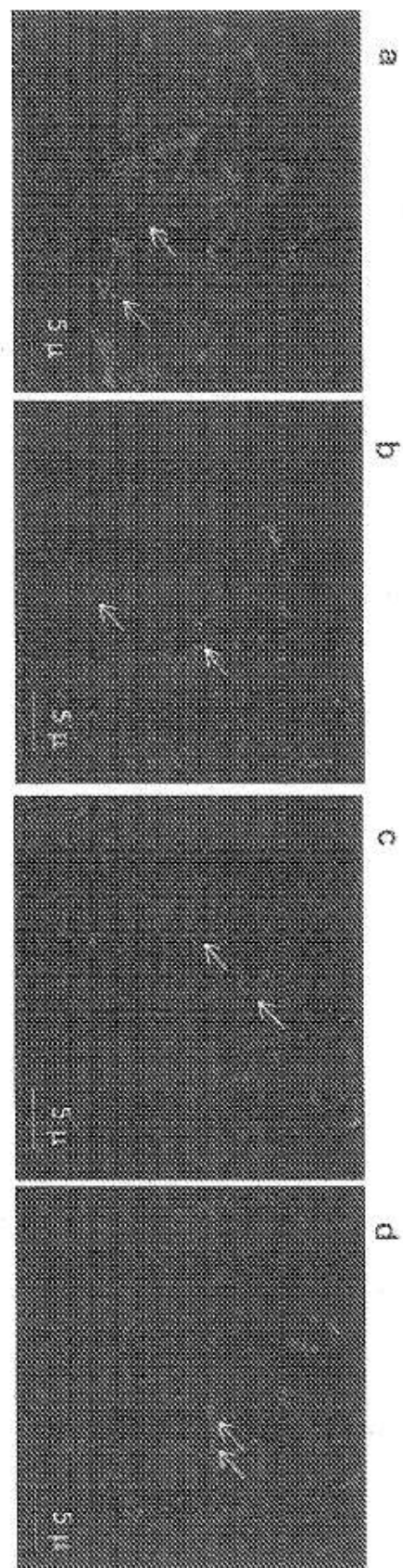


FIGURA 15

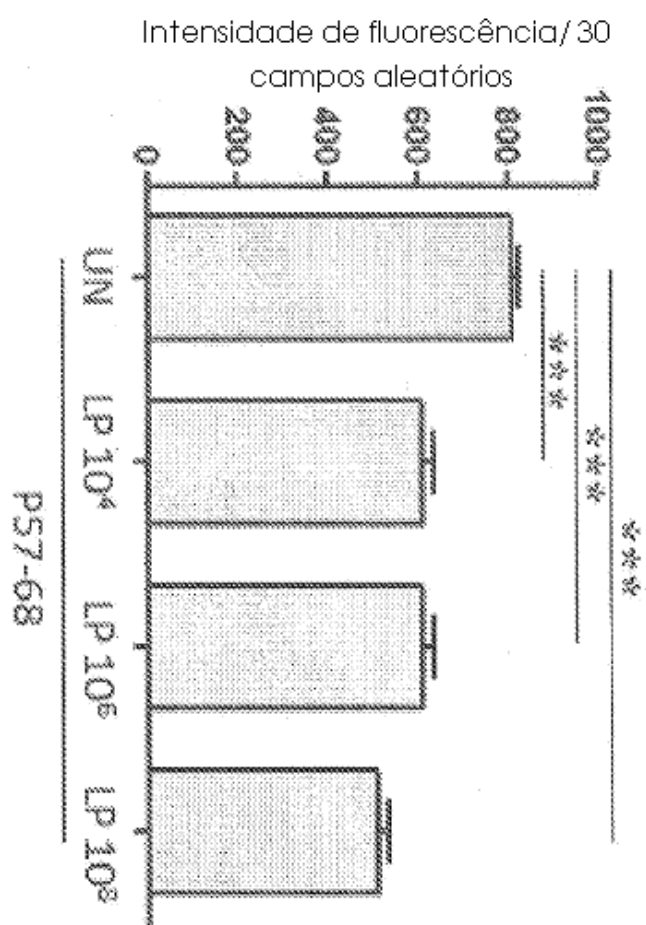


FIGURA 16

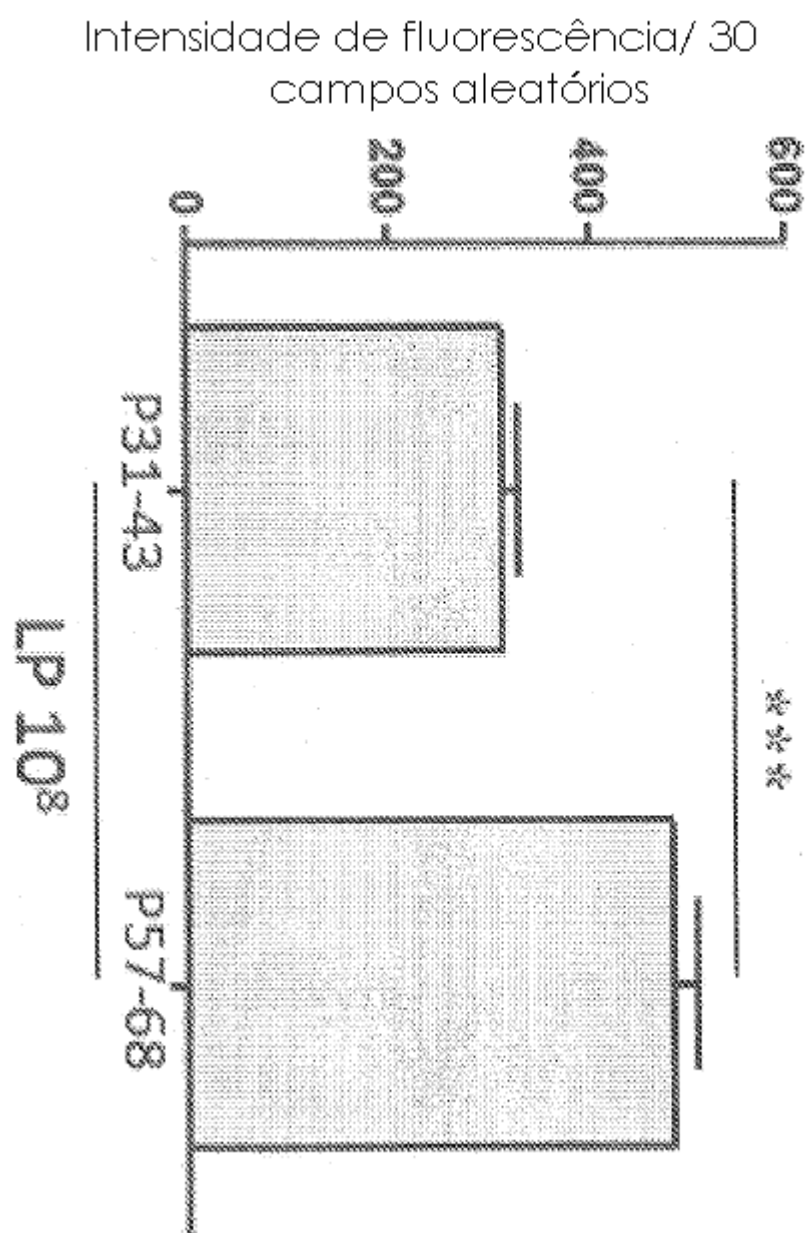


FIGURA 17

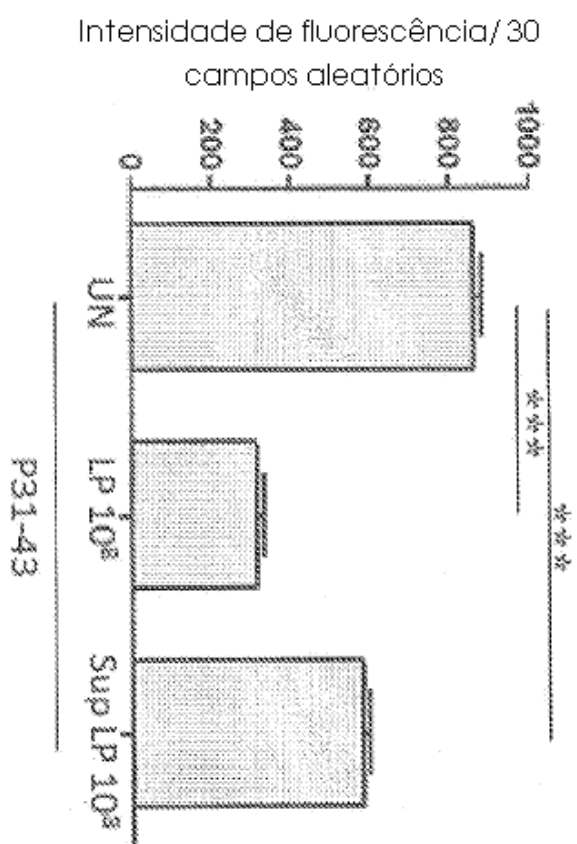


FIGURA 19

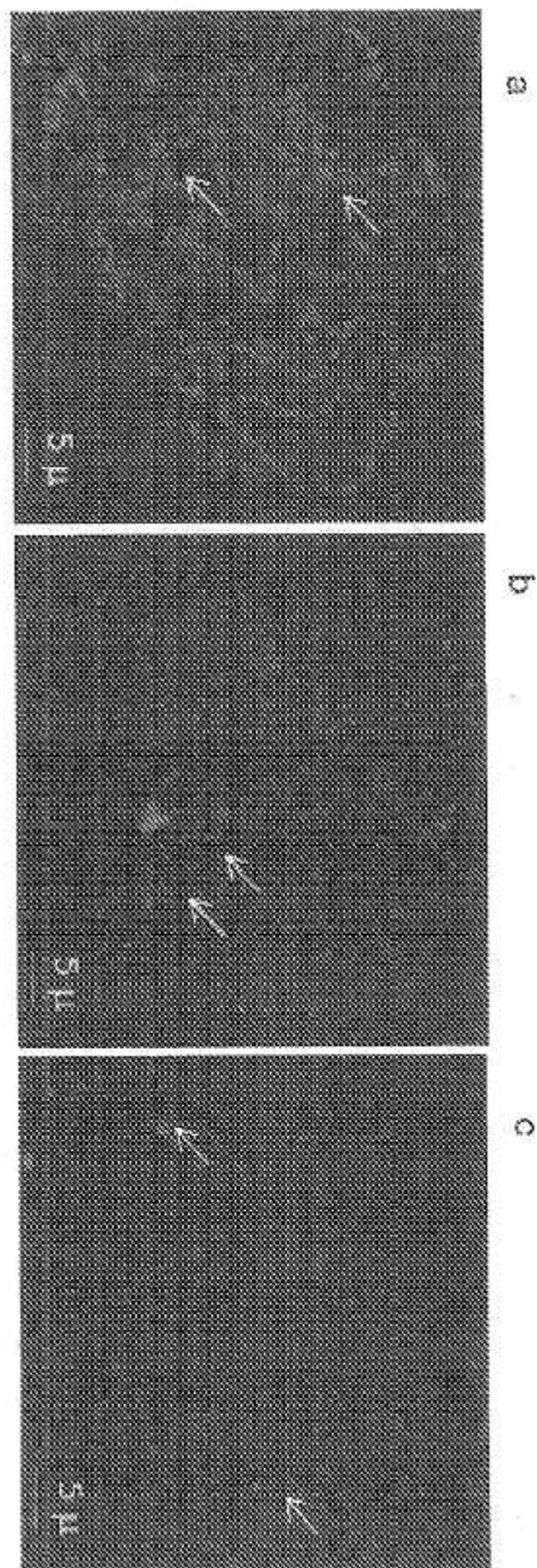


FIGURA 18

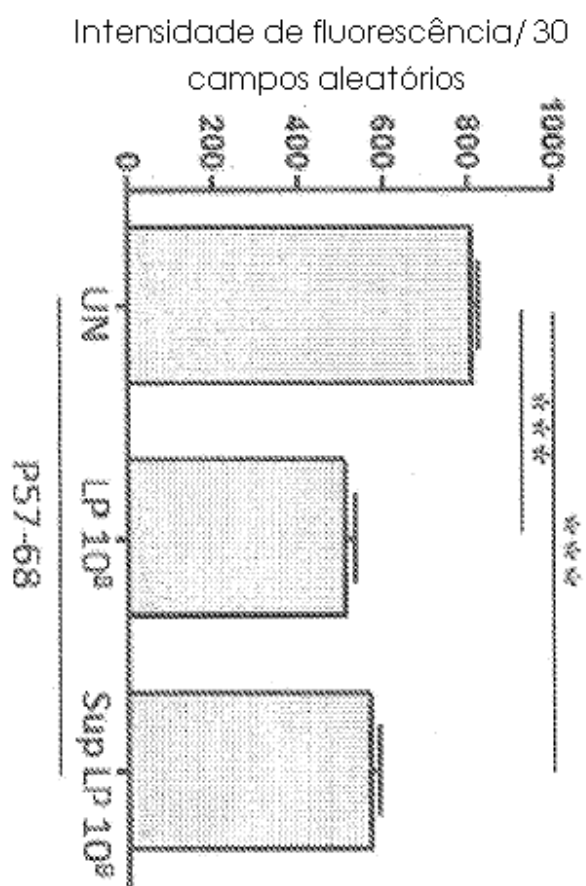


FIGURA 21

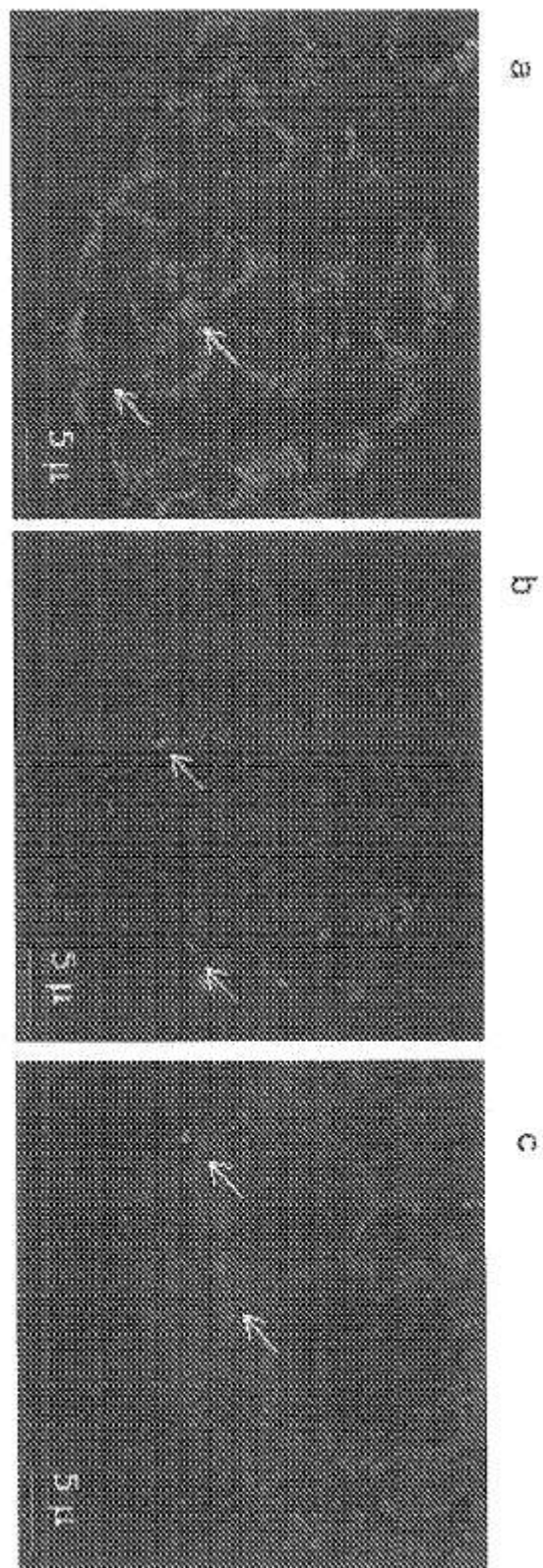


FIGURA 20

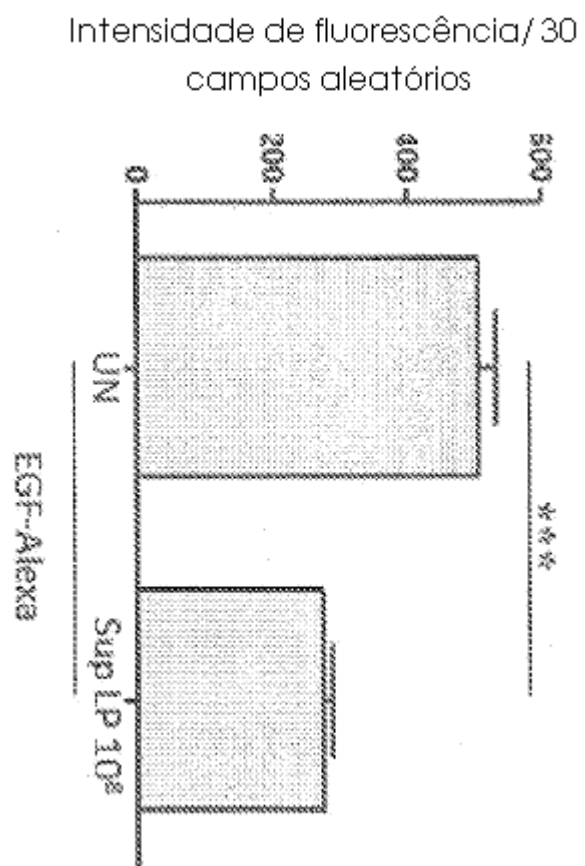
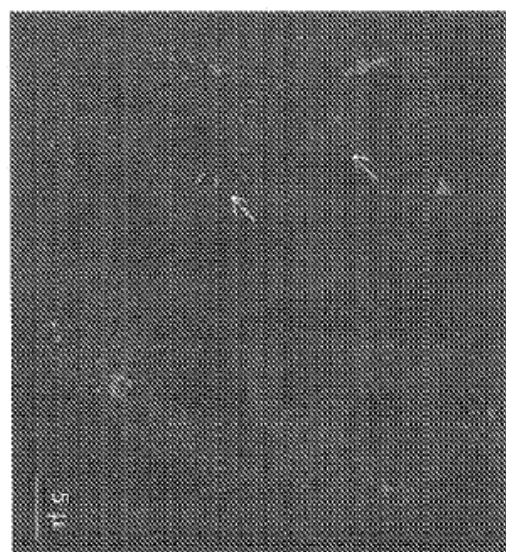
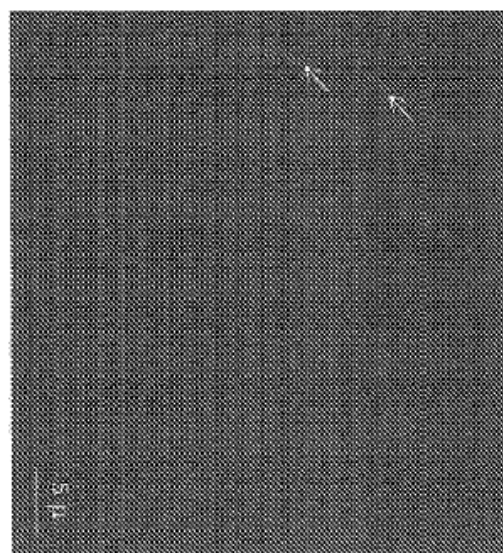


FIGURA 23



a



b

FIGURA 22

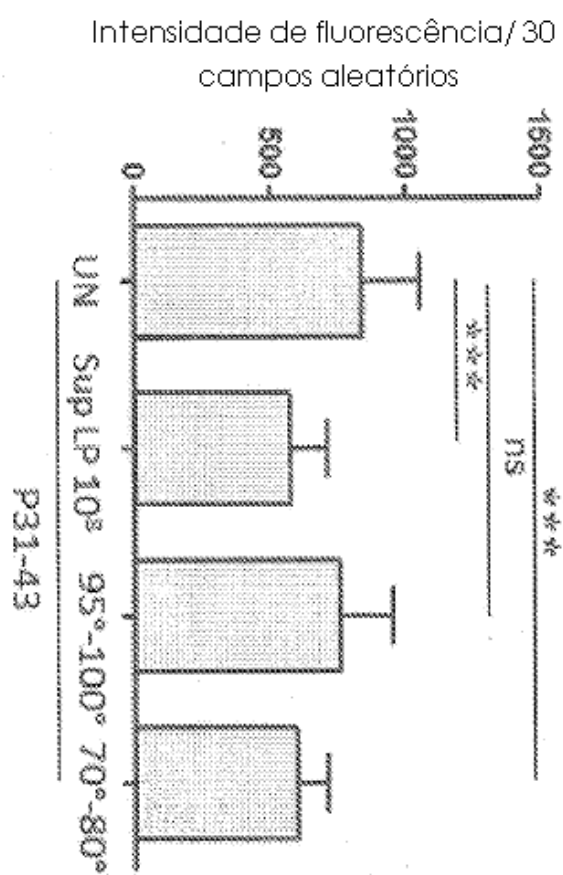


FIGURA 25

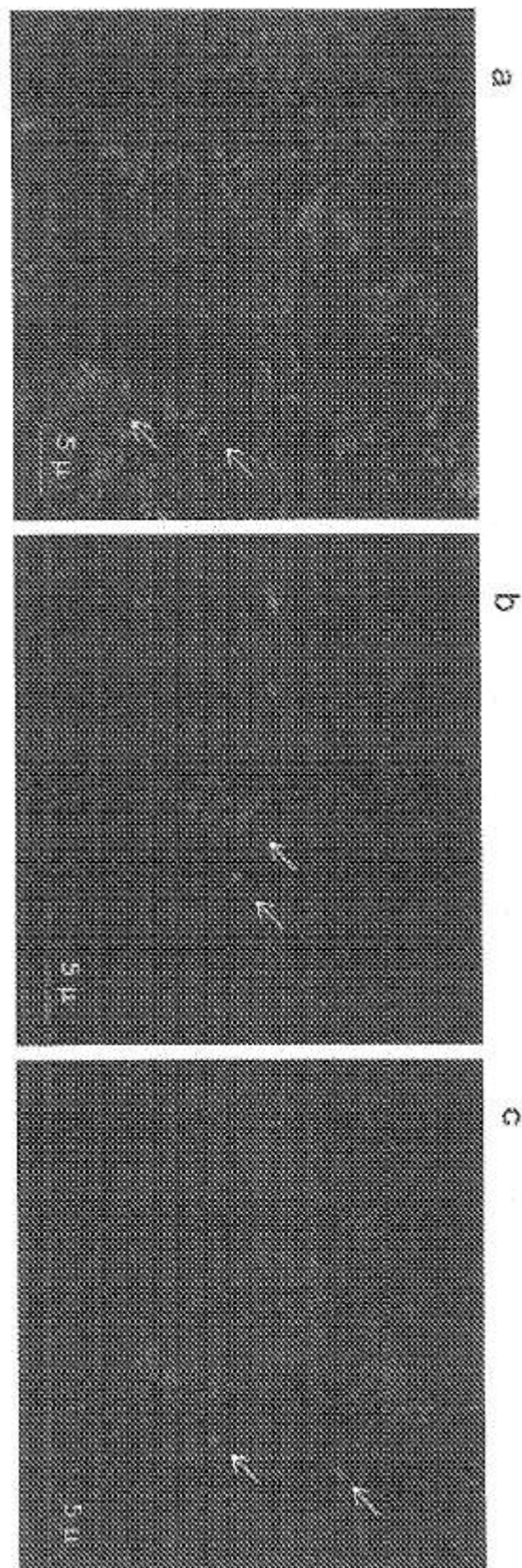


FIGURA 24

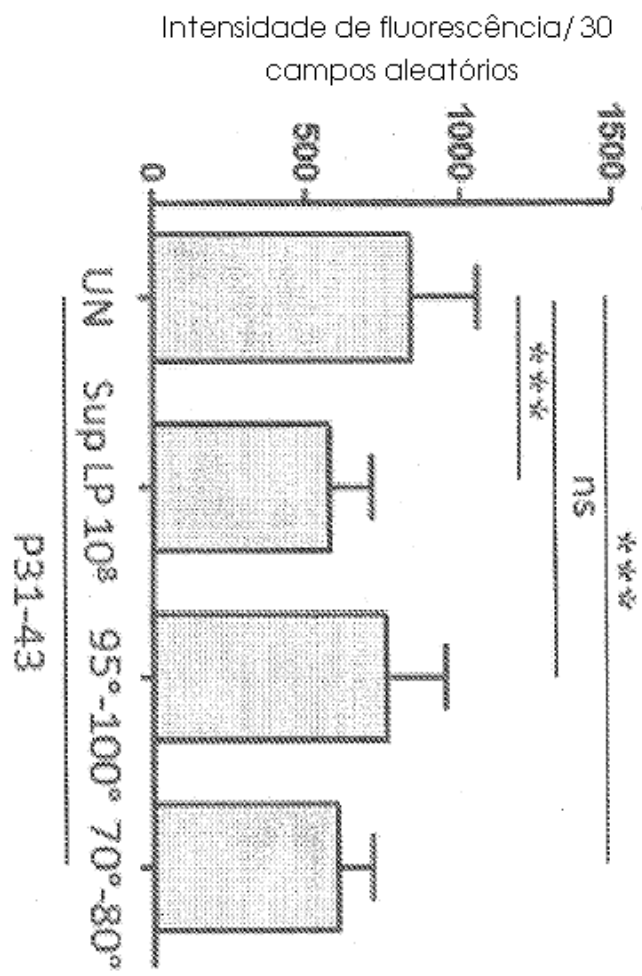


FIGURA 27

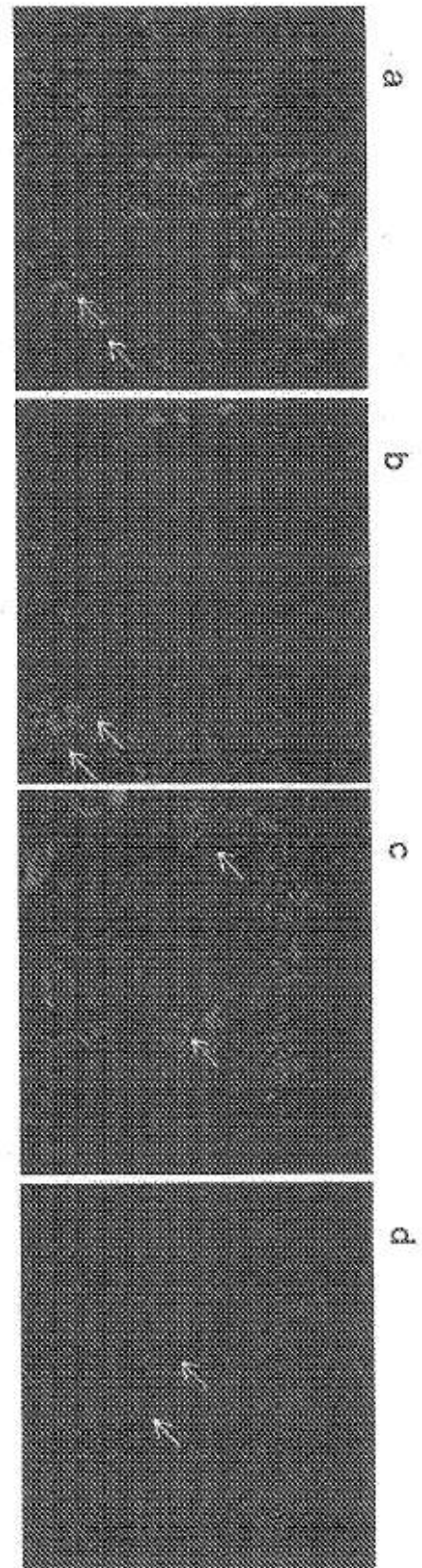


FIGURA 26