

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 324**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23C 9/127 (2006.01)
A23L 1/24 (2006.01)
A23C 19/00 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/23 (2006.01)
C12R 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.1998 E 10163944 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2241616**

54 Título: **Bacterias del ácido láctico que mejoran la inmunidad**

30 Prioridad:

21.08.1997 AU PO869997
28.04.1998 AU PP322598

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2013

73 Titular/es:

NEW ZEALAND DAIRY BOARD (100.0%)
PASTORAL HOUSE 25 THE TERRACE
WELLINGTON 1, NZ

72 Inventor/es:

GILL, HARSHARNJIT S.;
SMART, JOHN B. y
GOPAL, PRAMOD K.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 399 324 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Bacterias del ácido láctico que mejoran la inmunidad

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a nuevas cepas de bacterias del ácido láctico y su uso en la mejora de la inmunidad.

Técnica anterior

10

El consumo de productos que contienen bacterias del ácido láctico (BAL) está asociado a una serie de beneficios para la salud incluyendo la mejora de la inmunidad. Hay cientos de cepas de bacterias del ácido láctico pero sólo algunas cepas presentan propiedades que estimulan la salud. La capacidad de estas bacterias para tolerar ácidos y sales biliares, adheridas a células epiteliales de las mucosas y sobrevivir al paso por el tubo digestivo se considera un importante criterio para la selección de cepas que estimulan la salud. Sólo se han identificado hasta la fecha algunas cepas de bacterias del ácido láctico con beneficios para la salud demostrados.

15

Se conocen cepas de BAL que presentan buena adhesión a las células del epitelio mucosal del intestino delgado que se prestan de ese modo a aplicaciones terapéuticas a partir de la Patente de Nueva Zelanda 248057. Los microorganismos descritos en esta patente mejoran tanto la inmunidad natural (función de los fagocitos) como la inmunidad adquirida (respuestas de los anticuerpos y respuestas de proliferación de linfocitos).

20

Es deseable que haya otras bacterias BAL que mejoren un amplio espectro de respuestas inmunitarias incluyendo la función de los fagocitos.

25

Es un objeto de esta invención ir de algún modo a conseguir estas desideratas o al menos ofrecer al público una elección útil de bacterias del ácido láctico que mejoren la inmunidad.

30

Saxelin, M., 1.997, indica que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* probiótica LGG (ATCC 53103) puede sobrevivir y adherirse a células en el tubo digestivo, tratar o evitar trastornos intestinales tales como los causados por rotavirus y se pueden usar con seguridad en alimentos funcionales y clínicos (Saxelin M. 1.997. *Lactobacillus* GG – una cepa probiótica humana con amplia documentación clínica. *Food Rev. Int.* 13 (2): 293-313).

35

Descripción de la invención

De acuerdo con esto, en un aspecto la invención se puede decir, en general, que consiste en un cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus rhamnosus* HN001, AGAL número de depósito NM97/09514 fechado el 18 de agosto de 1.997.

40

En una realización dicha composición contiene dos o más cualesquiera de dichas cepas.

Preferiblemente dicho excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable es un alimento.

45

Preferiblemente dicho alimento es uno cualquiera de: leche cultivada, yogur, queso, bebida láctea o polvo lácteo.

Alternativamente, dicha composición es una composición farmacéutica y dicho excipiente o diluyente es excipiente o diluyente farmacológicamente aceptable.

50

En otra realización se puede decir, en general, que la invención consiste en un método para mejorar la inmunidad natural y adquirida que comprende administrar a un mamífero uno cualquiera de los cultivos biológicamente puros anteriores en una proporción de dosis inmunoestimulante.

55

En otra realización, están presentes cultivos sustancialmente biológicamente puros de dos o tres de las cepas ya definidas.

Preferiblemente dicho cultivo se administra en la forma de una composición con un excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable.

60

Preferiblemente dicho excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable es un alimento.

Preferiblemente dicho alimento es: leche cultivada, yogur, queso, bebida láctea o polvo lácteo.

Breve descripción de los dibujos

65

La Figura 1 muestra el efecto de enriquecimiento de ratones con producto fermentado con *L. rhamnosus* HN001 o producto no fermentado que contiene *L. rhamnosus* HN001 sobre la actividad de los fagocitos de leucocitos

sanguíneos periféricos como se describe en el ejemplo 5. Se alimentaron ratones BALB/c con dietas a base de leche que contenía 10^9 cfu (al día) de *L. rhamnosus* HN001 en producto fermentado o no fermentado durante 14 días. La actividad fagocítica de los leucocitos sanguíneos periféricos se determinó usando citometría de flujo y *Escherichia coli* marcada con isotiocianato de fluoresceína. Los valores son media \pm error estándar. Diferencias significativas (ANOVA, el programa SAS) del control: $**P < 0,0001$.

La Figura 2 muestra el efecto de enriquecimiento de ratones con *L. rhamnosus* HN001 vivos o *L. rhamnosus* HN001 matados por calor sobre la actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos periféricos como se describe en el ejemplo 7. Se alimentaron ratones BALB/c con dietas a base de leche y se administraron por vía oral 10^9 cfu (al día) de *L. rhamnosus* HN001 vivos o matados por calor durante 14 días. La actividad fagocítica de los leucocitos sanguíneos periféricos y macrófagos peritoneales se determinó usando citometría de flujo y *Escherichia coli* marcada con isotiocianato de fluoresceína. Los valores son media \pm error estándar. Diferencias significativas (ANOVA, el programa SAS) del control, $**P < 0,0001$.

La Figura 3 muestra el efecto de enriquecimiento de ratones con *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 sobre traslocaciones de las bacterias en ratones expuestos a *S. typhimurium* como se describe en el ejemplo 8. Se expusieron ratones BALB/c no enriquecidos y enriquecidos con *B. lactis* HN019 o *L. rhamnosus* HN001 por vía oral a *S. typhimurium* después de enriquecimiento diario continuo. Seis días después se mataron humanitariamente los ratones expuestos y se recogieron los hígados y bazo para controlar la traslocación bacteriana. Después se cultivaron suspensiones de tejidos de los órganos recogidos en placas de agar MacConkey durante 24-48 h previas a enumeración. Los valores son media \pm error estándar. Diferencias significativas (ANOVA, el programa SAS) del control: $*P < 0,05$.

La Figura 4 muestra el efecto de enriquecimiento de ratones con *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 sobre la actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos periféricos de ratones expuestos a *S. typhimurium* como se describe en el ejemplo 8. Se expusieron ratones BALB/c no enriquecidos y enriquecidos con *B. lactis* HN019 o *L. rhamnosus* HN001 por vía oral a *S. typhimurium* después de enriquecimiento diario continuo. La actividad fagocítica de los leucocitos sanguíneos periféricos se determinó seis días después de exposición usando citometría de flujo y *Escherichia coli* marcada con isotiocianato de fluoresceína. Los valores son media \pm error estándar. Valores (media \pm error estándar) con diferentes sobreescritos son significativamente diferentes (ANOVA, el programa SAS): $P < 0,01$.

La Figura 5 muestra el efecto de enriquecimiento de ratones con *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 sobre las respuestas proliferativas de los linfocitos del bazo de ratones expuestos a *S. typhimurium* como se describe en el ejemplo 8. Se expusieron ratones BALB/c no enriquecidos y enriquecidos con *B. lactis* HN019 o *L. rhamnosus* HN001 por vía oral a *S. typhimurium* después de enriquecimiento diario continuo. Seis días después de exposición se midieron las respuestas proliferativas de los linfocitos del bazo de manera colorimétrica después de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina durante las 16 h finales de la incubación de 96 h. Los valores (media \pm error estándar) con diferentes sobreescritos son significativamente diferentes (ANOVA, el programa SAS): $P < 0,01$.

Modos de llevar a cabo la invención

Se han depositado cultivos liofilizados de las cuatro cepas de bacterias en los Laboratorios Analíticos del Gobierno Australiano (AGAL, por sus siglas en inglés), El Laboratorio Regional de Nueva Gales del Sur, Calle Suakin 1, Pymble, NSW 2.073, Australia. Son detalles de los depósitos:

Cepa	Número	Fecha
<i>L. acidophilus</i> HN017	NM97/09515	18 de agosto de 1.997
<i>L. rhamnosus</i> HN001	NM97/09514	18 de agosto de 1.997
<i>B. lactis</i> HN019	NM97/09513	18 de agosto de 1.997
<i>L. rhamnosus</i> HN067	NM97/01925	11 de febrero de 1.998

Se ha encontrado que las cuatro cepas identificadas anteriormente mejoran un amplio espectro de respuestas inmunitarias incluyendo respuestas inmunitarias tanto naturales como adquiridas.

Ejemplo 1 – Morfología y propiedades generales

Se usaron análisis RAPD, secuenciación de ARNr 16S y análisis SDS-PAGE para confirmar la caracterización taxonómica de las cepas. También se encontró que *L. acidophilus* HN017 era genéticamente diferente de *L. acidophilus* (LC1) de la Patente de Nueva Zelanda N° 248057.

Se usaron análisis RAPD, secuenciación de ARNr 16S y análisis SDS-PAGE para confirmar la caracterización taxonómica de *L. rhamnosus* HN067; cebadores específicos de las especies usados para caracterización de *L. rhamnosus* HN067 a nivel molecular incluido Pr I (directo) 5-CAGACTGAAAGTCTGACGG-3 y Pha II (inverso) 5-GCGATGCG AATTTCTATTATT-3.

La morfología y las propiedades de fermentación del azúcar de esta cepa se detallan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1 – Morfología y otras características

<i>L. acidophilus</i> HN017	<i>L. rhamnosus</i> HN001	<i>B. lactis</i> HN019	<i>L. rhamnosus</i> HN067
Varillas cortas a medias con extremos redondos, que tienen lugar generalmente por separado o en pares o cadenas cortas, cuando se cultivan en caldo MRS.	Varillas cortas a medias con extremos cuadrados en cadenas, generalmente 0,7 x 1,1 x 2,0 – 4,0 µm, cuando se cultivan en caldo MRS.	Varillas microaerófilicas a anaerobias con formas características tales como células ensanchadas medias, disposición de células en "V" o empalizada cuando se cultivan sobre placas de agar TPY.	Varillas cortas a medias con extremos cuadrados en cadenas, generalmente 0,7 x 1,1 x 2,0 a 4,0 µm, cuando se cultivan en caldo MRS.
Varillas facultativamente anaerobias, catalasa negativas, que no forman esporas, gram positivas, con temperatura de crecimiento óptimo de 37±1°C y pH óptimo de 6,0-6,5. Estas son bacterias obligatoriamente homofermentativas y no se produce gas de glucosa.	Varillas anaerobias facultativas, catalasa negativas, que no forman esporas, no móviles, gram positivas, con temperatura de crecimiento óptimo de 37±1°C y pH óptimo de 6,0-6,5. Estas son bacterias facultativamente heterofermentativas y no se produce gas de glucosa.	En caldo MR5 con hidrocloreuro de cisteína al 0,05%, forman células ensanchadas medias y células con forma de palo de golf (extremidades espatuladas). Varillas catalasa negativas, no móviles y que no forman esporas, gram positivas, con temperatura de crecimiento óptimo de 37±1°C y pH óptimo de 6,0-7,0. Fructosa-6-fosfato-fosfo-cetolasa positivas.	Varillas anaerobias facultativas, que no forman esporas, no móviles, catalasa negativas, gram positivas, con temperatura de crecimiento óptimo de 37±1°C y pH óptimo de 6,0-6,5. Estas son bacterias facultativamente heterofermentativas y no se produce gas de glucosa.

5

Tabla 2 – Modelo de fermentación de carbohidratos de cepas de Lactobacillus y Bifidobacterium seleccionadas.

Nº S1.	Nombre de la bacteria	Puntuación*
1	<i>L. acidophilus</i> HN 017	5755546
2	<i>L. rhamnosus</i> HN001	5757177
3	<i>B. lactis</i> HN019	1051622
4	<i>L. rhamnosus</i> HN067	5757175

Se usó estuche de fermentación de azúcar API 50 CH para determinar el modelo de fermentación del azúcar.

10

* Las puntuaciones se basan en puntuaciones de 22 azúcares prominentes (manual de Bergey)

Ejemplo 2 – Adhesión a células intestinales

15

La capacidad de las cepas probióticas para adherirse a células epiteliales intestinales humanas (HT-29 y CaCo-2) se evaluó *in vitro* usando estirpes celulares diferenciadas. Se cultivaron monocapas de células HT-29 y CaCo-2 sobre placas de portaobjetos y se pusieron en placas de múltiples pozos. Después se añadieron 10⁸ cfu/ml de BAL en 1 ml de sobrenadante de cultivo gastado a capas de células junto con 1 ml de medio DMEM y se incubaron durante 1 h a 37°C en 10% de CO₂-90% de aire. Se lavaron las monocapas 4 veces con PBS, se fijaron en metanol, se tñieron con tinción de Gram y se determinó de manera microscópica el número de bacterias adheridas a células epiteliales. De promedio, se contaron 20 campos y los resultados se resumen en la Tabla 3.

20

Tabla 3 – Adherencia a estirpes* celulares HT-29 y CaCo-2

CEPA	HT-29	CaCo-2
<i>L. acidophilus</i> HN 017	98 ± 17	171 ± 16
<i>L. rhamnosus</i> HN 001	161 ± 18	218 ± 35
<i>B. lactis</i> HN 019	188 ± 27	194 ± 25

25

* Número (media ± SEM) de bacterias/100 células epiteliales

Ejemplo 3 – Mejora de la inmunidad natural y adquirida

Se examinaron los efectos que mejoran la inmunidad de las tres cepas *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 y *B. lactis* HN019 determinando la función de los fagocitos (leucocitos sanguíneos y macrófagos peritoneales) y cuantificando las concentraciones de anticuerpos específicos a antígenos proteicos usados para imitar respuestas a vacunas en ratones.

- 5 Se usó el siguiente protocolo experimental:
1. Se usaron ratones BALB/c de seis a siete semanas, que pesaban 20-30 g.
 - 10 2. Se distribuyeron los ratones de manera aleatoria en diferentes grupos de tratamiento (Tabla 4).
 3. Se alimentaron los ratones con *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 (10^9 cfu/día) en 50 μ l de leche desnatada durante 10 días. Los ratones de control recibieron 50 μ l de leche desnatada en polvo sólo.
 - 15 4. Todos los ratones recibieron dieta a base de leche desnatada en polvo durante todo el experimento.

Los leucocitos sanguíneos y macrófagos de ratones que recibieron *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 mostraron una capacidad fagocítica significativamente mayor comparado con células de ratones de control (Tabla 4). La producción de radicales oxígeno (explosión oxidativa) por leucocitos de ratones de alimentación probiótica también fue mayor que para los ratones de control (datos no mostrados).

Tabla 4 - El efecto de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 y *B. lactis* HN019 dietéticos sobre la función fagocítica en ratones

Tratamiento	% Leucocitos sanguíneos con actividad fagocítica	% Macrófagos peritoneales con actividad fagocítica
Control	14,33 \pm 0,87	66,1 \pm 3,5
<i>L. acidophilus</i> HN017	22,7 \pm 1,21**	79,0 \pm 1,0 **
<i>L. rhamnosus</i> HN001	24,84 \pm 0,93 **	80,5 \pm 1,8 **
<i>B. lactis</i> HN019	23,19 \pm 0,95 **	77,4 \pm 2,6 *

25 Se administraron por vía oral a ratones BALB/c 10^9 cfu (al día) de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 durante 10 días. Se determinó la actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos y macrófagos peritoneales usando citometría de flujo y *Escherichia coli* marcada con isotiocianato de fluoresceína. Los valores son media \pm error estándar. Diferencias significativas (prueba t de Student) del control: *P < 0,05, **P < 0,01.

30 La concentración de anticuerpos IgG específicos en los sueros y en los lavados intestinales de ratones que recibieron *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 también fue mayor que la de ratones de control (Tabla 5).

35 Tabla 5 - El efecto de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 y *B. lactis* HN019 dietéticos sobre las respuestas de anticuerpos en suero y mucosas.

Tratamiento	Respuesta de anticuerpos en suero (unidades/ml)	Respuesta de anticuerpos en mucosas (unidades/ml)
Control	80,2 \pm 6,0	1.350 \pm 96,0
<i>L. acidophilus</i> HN017	134,6 \pm 25,2 *	1.548 \pm 270,0
<i>L. rhamnosus</i> HN001	118,5 \pm 12,5 **	1.512 \pm 198,0
<i>B. lactis</i> HN019	158,1 \pm 51,6***	1.548 \pm 234,0

40 Se administraron por vía oral a ratones BALB/c 10^9 cfu (al día) de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 durante 10 días. Se inmunizaron los ratones con toxina de cólera (un antígeno usado para imitar la infección entérica) los días 0 y 7. La concentración de anticuerpos específicos en suero y secreciones intestinales se midió usando ELISA el día 10. Los valores representan media \pm error estándar. Diferencias significativas (prueba t de Student) del control: *P = 0,08; **P<0,05; ***P<0,01.

45 Ejemplo 4 – Efectos de inmunoestimulación después de enriquecimiento con BAL durante cuatro semanas.

Los efectos inmunoestimulantes de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 y *B. lactis* HN019 se evaluaron en ratones usando el siguiente protocolo experimental:

- 50 1. Se usaron ratones BALB/c de seis a siete semanas, que pesaban 20-30 g.
2. Se distribuyeron los ratones de manera aleatoria (18/grupo) en diferentes grupos de tratamiento.

3. Después de aclimatización (durante 7 días), se les dieron a los ratones 10^9 cfu (al día) de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 en 50 µl de leche desnatada, durante 28 días (desde el día 0 al día 28). Los ratones de control recibieron 50 µl de leche desnatada (sin ningún microorganismo) sólo.

5 4. Se ofreció a los ratones una dieta a base de leche desnatada en polvo y agua a voluntad, durante todo el experimento.

10 5. Se evaluaron los efectos inmunoestimulantes por control de la actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos y macrófagos peritoneales, actividad de las células-NK de linfocitos esplénicos, respuestas de proliferación de linfocitos (células del bazo) para un mitógeno de células-T, ConA (un indicador de inmunidad mediada por células) y respuestas de los anticuerpos a vacuna de tétanos.

15 Como se ve en la Tabla 6, los leucocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos) de ratones que recibieron *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 presentaron actividad fagocítica significativamente mayor (un indicador de inmunidad natural) que los leucocitos de ratones de control.

Tabla 6 - El efecto de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 y *B. lactis* HN019 dietéticos en ratones.

Tratamiento	% Leucocitos sanguíneos con actividad fagocítica	% Macrófagos peritoneales con actividad fagocítica
Control	15,5	72,67
<i>L. acidophilus</i> HN017	29,4**	82,2*
<i>L. rhamnosus</i> HN001	24,2**	82,8**
<i>B. lactis</i> HN019	31,1**	83,0**

20 Se les dieron a los ratones (18/grupo) 10^9 cfu (al día) de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 en 50 µl de leche desnatada durante 28 días. Se determinó la actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos/macrófagos peritoneales el día 28 usando citometría de flujo y *E. coli* marcada con isotiocianato de fluoresceína. Los valores son medias cuadradas mínimas. Diferencias significativas (el análisis SAS): *P < 0,002, **P < 0,0005.

25 El consumo de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 durante 28 días también dio como resultado un aumento en la actividad de las células-NK, respuestas de proliferación de linfocitos a ConA y respuestas de los anticuerpos a vacuna de Tétanos. Para todos estos indicadores de inmunocompetencia, los ratones que recibieron *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 presentaron mayores respuestas que los de los ratones de control (Tabla 7).

30 Además estos resultados muestran que el enriquecimiento durante periodos prolongados con *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 es capaz de inducir una mejora sostenida en diversos aspectos de inmunidad natural y adquirida.

35 Tabla 7 - El efecto de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 y *B. lactis* HN019 dietéticos sobre la actividad de las células-NK y respuestas de proliferación de linfocitos a ConA y respuestas de los anticuerpos a vacuna de Tétanos.

Tratamiento de ConA	Actividad de las células NK (%)	Proliferación de los linfocitos para ConA (absorbancia)	Respuestas de los anticuerpos a vacuna del Tétanos (unidades/ml)
Control	8,8	1,4 ±0,125	402,5 ±41,4
<i>L. acidophilus</i> HN017	9,9	1,6 ±0,44	923,9 ± 116,0*
<i>L. rhamnosus</i> HN001	11,5	1,8 ±0,1*	711,5 ±127,2*
<i>B. lactis</i> HN019	10,5	1,7 ±0,5*	844,6 ± 134,7*

40 Se dieron a los ratones (18/grupo) 10^9 cfu (al día) de *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 o *B. lactis* HN019 en 50 µl de leche desnatada durante 28 días (es decir, desde los días 0 a 28). La actividad de las células-NK de los linfocitos esplénicos se determinó el día 28 usando citometría de flujo y células Yac-1 marcadas con D275. Las respuestas de proliferación de los linfocitos de linfocitos esplénicos a ConA se evaluaron el día 28 usando un estuche de proliferación de células comercial (Boehringer Mannheim, Alemania). Para las respuestas de los anticuerpos, se inmunizaron ratones con vacuna de Tétanos (50 µl/dosis, CSL, Australia) los días 7 y 21. La concentración de los anticuerpos específicos se determinó usando un ELISA; se usó antígeno suministrado por los fabricantes de vacunas (CSL, Australia) para placas de recubrimiento. Los valores son medias cuadradas mínimas de 18 ratones. Diferencias significativas (el análisis SAS): *P <0,05.

50 Ejemplo 5 – Mejora de la inmunidad natural y adquirida usando productos fermentados frente a no fermentados.

El objeto fue evaluar la eficacia inmunoestimuladora de yogur fabricado (fermentado) usando la cepa probiótica *L. rhamnosus* HN001 comparado con producto no fermentado que contiene *L. rhamnosus* HN001. Los efectos inmunoestimuladores se examinaron determinando la función fagocítica (leucocitos sanguíneos periféricos y macrófagos peritoneales) y respuestas proliferativas de los linfocitos a un mitógeno de células-B (LPS).

Se usó el siguiente protocolo experimental:

1. Se usaron ratones BALB/c de seis a siete semanas, que pesaban 20-30 g.
2. Se distribuyeron los ratones de manera aleatoria en diferentes grupos de tratamiento.
3. Los ratones de control recibieron una dieta a base de leche entera en polvo durante todo el experimento.
4. Los ratones del ensayo recibieron 2,5 g de yogur fabricado usando *L. rhamnosus* HN001 (10^9 cfu/día) o 2,5 g de leche completa que contenía *L. rhamnosus* HN001 (10^9 cfu/día) al día así como una dieta a base de leche entera en polvo durante 14 días.

Resultados

Los ratones que recibieron yogur fabricado con *L. rhamnosus* HN001 o leche entera que contenía *L. rhamnosus* HN001 mostraron un nivel significativamente mayor de actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos periféricos que se observó en ratones que recibieron la dieta de control (Fig. 1). Este aumento visto con independencia de si se suministraba *L. rhamnosus* HN001 en el yogur (fermentado con *L. rhamnosus* HN001) o producto no fermentado que contenía *L. rhamnosus* HN001. No hubo diferencia en el nivel de actividad fagocítica entre ratones que recibían el yogur fermentado fabricado usando *L. rhamnosus* (HN001) comparado con producto WMP no fermentado que contenía *L. rhamnosus* (HN001).

Los ratones alimentados con producto tanto no fermentado como fermentado con *L. rhamnosus* HN001 mostraron mayores respuestas proliferativas de los linfocitos a LPS que los ratones de control (Tabla 8). No hubo diferencia significativa en la respuesta entre los ratones que recibieron producto no fermentado que contenía *L. rhamnosus* HN001 y los ratones que recibieron producto fermentado con *L. rhamnosus* HN001.

Tabla 8 - El efecto de *L. rhamnosus* HN001 fermentado y no fermentado sobre las respuestas proliferativas de los linfocitos en ratones

Tratamiento	Proliferación de linfocitos a LPS (absorbancia)
Control (WMP)	0,4699 ± 0,028
WMP Fermentado con <i>L. rhamnosus</i> HN001	0,5361 ± 0,028
WMP No fermentado con <i>L. rhamnosus</i> HN001	0,5518 ± 0,028*

Se alimentaron ratones BALB/c sobre dietas a base de leche que contenían 10^9 cfu (al día) de *L. rhamnosus* HN001 en producto no fermentado o yogur fabricado con *L. rhamnosus* HN001 (producto fermentado) durante 14 días. Los ratones de control recibieron dieta a base de leche sin ninguna BAL. Se midieron de manera colorimétrica las respuestas proliferativas después de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina durante las 16 h finales de la incubación de 96 h. Los valores son medias ± error estándar. Diferencias significativas (prueba t de Student) del control: *P=0,05.

Además estos resultados sugieren que el enriquecimiento con *L. rhamnosus* HN001 mejora una serie de funciones inmunitarias incluyendo actividad fagocítica y proliferación de células linfocíticas. *L. rhamnosus* HN001 presentada en producto fermentado o no fermentado es eficaz en la obtención de aumento de la función inmunitaria con producto fermentado dando una respuesta mayor para algunas funciones y siendo no fermentado superior en otros.

Ejemplo 6 – Mejora de inmunidad natural y adquirida por *L. rhamnosus* HN067

Experimento 1.

Los efectos inmunoestimulantes de *L. rhamnosus* HN067 se examinaron por control de la capacidad fagocítica de los leucocitos sanguíneos periféricos y macrófagos peritoneales (indicador de inmunidad no específica) y cuantificación de concentraciones de anticuerpos específicos para un antígeno de inmunización, toxina de cólera (usada para imitar las respuestas a vacunas entéricas) en ratones.

Se usó el siguiente protocolo experimental:

1. Se usaron ratones BALB/c de seis a siete semanas, que pesaban 20-30 g. Se alimentaron con una dieta a base de leche desnatada durante todo el experimento.

5 2. Se administró por vía oral a los ratones en el grupo de ensayo (n=6) *L. rhamnosus* HN067 (10^9 cfu/día) en 50 µl de leche desnatada durante 10 días. Los ratones de control (n=6) recibieron 50 µl de leche desnatada en polvo (sin ninguna BAL) sólo.

Resultados

10 Los leucocitos sanguíneos y macrófagos peritoneales de los ratones que recibieron *L. rhamnosus* HN067 mostraron actividad fagocítica significativamente mayor (función fagocítica mejorada) comparado con células de los ratones de control. Los resultados se señalan en la Tabla 9 a continuación.

15 Tabla 9 - El efecto de *L. rhamnosus* HN067 dietético sobre la función de los fagocitos

Tratamiento	% Leucocitos sanguíneos con actividad fagocítica	% Macrófagos peritoneales con actividad fagocítica
Control	13,1 ± 1,5	76,4 ± 1,9
<i>L. rhamnosus</i> HN067	23,7 ± 1,5**	87,2 ± 1,9*

20 Se alimentaron ratones BALB/c (6/grupo) con dieta a base de leche con o sin administración oral de *L. rhamnosus* HN067 (10^9 cfu/día) durante 10 días. La actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos y macrófagos peritoneales se determinó usando citometría de flujo y *E. coli* marcada con isotiocianato de fluoresceína. Los valores representan media cuadrada mínima ± error estándar LSM. Diferencias significativas (el programa SAS) del control: *P=0,0005, **P=0,0001.

25 La concentración de anticuerpos específicos a toxina de cólera, un antígeno usado para inmunización oral, en los sueros y en los lavados intestinales de ratones que recibieron *L. rhamnosus* HN067 fue también significativamente mayor que la de ratones de control (Tabla 10).

Tabla 10 - El efecto de enriquecimiento dietético con *L. rhamnosus* HN067 sobre las respuestas de los anticuerpos en suero y en mucosas a toxina de cólera.

Tratamiento	Respuesta de anticuerpos en suero (unidades/ml)	Respuesta de anticuerpos en mucosa (unidades/ml)
Control	63,1 ± 43,2	1.969,7 ± 279,5
<i>L. rhamnosus</i> HN067	246,5 ± 43,2**	2.995,5 ± 465,2*

30 Se alimentaron ratones BALB/c con dieta a base de leche con o sin *L. rhamnosus* HN067 (10^9 cfu/día) durante 10 días. Se inmunizaron ratones por vía oral con toxina de cólera (10 µg/dosis), un antígeno usado para imitar infección entérica, los días 0 y 7. Los niveles de anticuerpos en suero y secreciones intestinales se midieron usando ELISA el día 10. Los valores representan media cuadrada mínima ± error estándar LSM. Diferencias significativas (el programa SAS) del control: *P=0,02; **P=0,0039.

Experimento 2.

40 Los efectos inmunoestimulantes de *L. rhamnosus* HN067 se evaluaron en ratones usando el siguiente protocolo experimental:

1. Se usaron ratones BALB/c de seis a siete semanas, que pesaban 20-30 g. Se les ofreció dieta a base de leche desnatada en polvo y agua a voluntad, durante todo el experimento.

45 2. Después de aclimatización durante 7 días, se les administró a los ratones en el grupo 1 (n=20) por vía oral 10^9 cfu (al día) de *L. rhamnosus* HN067 en 50 µl de leche desnatada (grupo 1 n=20) durante 14 días. Los ratones de control (grupo 2, n=20) recibieron leche desnatada sin ningún microorganismo.

50 3. Los efectos inmunoestimulantes se evaluaron por control de la actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos y macrófagos peritoneales y respuestas de proliferación de linfocitos de bazo a fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés) y lipopolisacárido (LPS) (mitógenos de células T y B, respectivamente).

55 Resultados

Los leucocitos sanguíneos y macrófagos peritoneales de ratones que recibieron *L. rhamnosus* HN067 presentaron

actividad fagocítica significativamente mayor (un indicador de inmunidad natural) que los leucocitos y macrófagos de los ratones de control (Tabla 11).

Tabla 11 - El efecto de *L. rhamnosus* HN067 dietético sobre la función fagocítica en ratones.

Tratamiento	% Leucocitos sanguíneos con actividad fagocítica	% Macrófagos peritoneales con actividad fagocítica
Control	13,7 ± 0,07	64,6 ± 2,1
<i>L. rhamnosus</i> HN067	22,5 ± 0,07**	75,8 ± 1,7*

Se alimentaron ratones BALB/c con dieta a base de leche con o sin administración oral de *L. rhamnosus* HN067 (10^9 cfu/día) durante 14 días. Se determinó la actividad fagocítica de leucocitos sanguíneos/macrófagos peritoneales el día 14 usando citometría de flujo y *E. coli* marcada con isotiocianato de fluoresceína. Los valores representan media cuadrada mínima ± error estándar LSM. Diferencias significativas (el programa SAS): *P=0,002, **P=0,0001.

Los ratones que recibieron *L. rhamnosus* HN067 durante 14 días también mostraron mayores respuestas de proliferación de linfocitos a PHA y LPS comparado con ratones de control (Tabla 12).

Tabla 12 - El efecto de enriquecimiento de *L. rhamnosus* HN067 sobre las respuestas de proliferación de linfocitos a PHA y LPS.

Tratamiento de ConA	Proliferación de linfocitos para PHA	Proliferación de linfocitos para LPS
Control	1, 18 ± 0, 08	0, 99 ± 0, 07
<i>L. rhamnosus</i> HN067	1, 37 ± 0, 07*	1, 24 ± 0, 06**

Se alimentaron ratones BALB/c con dieta a base de leche con o sin administración oral de *L. rhamnosus* HN067 (10^9 cfu/día) durante 14 días. Las respuestas de proliferación de linfocitos de células de bazo a PHA y LPS se evaluaron el día 14 usando un estuche de proliferación celular comercial (Boehringer Mannheim, Alemania). Los valores representan media cuadrada mínima ± error estándar LSM. Diferencias significativas (el programa SAS): *P<0,08, **P<0,01.

En resumen, los ratones que recibieron *L. rhamnosus* HN067 mostraron mejora significativa de una serie de respuestas inmunitarias del huésped incluyendo la función fagocítica de los leucocitos, las respuestas de los anticuerpos a inmunización oral y respuestas de proliferación de los linfocitos a mitógenos de células T y B. Los leucocitos sanguíneos (neutrófilos y monocitos) y macrófagos son efectores principales de inmunidad natural y desempeñan un papel principal en la protección frente a infecciones microbianas. También está documentada una correlación entre respuestas de proliferación de linfocitos *in vitro* a mitógenos (mitógenos de células T y B) e inmunocompetencia de un individuo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el enriquecimiento con *L. rhamnosus* HN067 es capaz de mejorar diversos aspectos de la inmunidad natural y adquirida.

Ejemplo 7 – Mejora de la inmunidad natural y adquirida usando *L. rhamnosus* HN001 vivo y muerto por calor.

El objeto del presente estudio fue investigar los efectos inmunoestimuladores de la cepa probiótica *L. rhamnosus* HN001 cuando estaba presente en la forma viva o matada por calor. El efecto sobre la función inmunitaria se evaluó por determinación de la actividad fagocítica de los leucocitos sanguíneos periféricos. El efecto de *L. rhamnosus* HN001 vivos y matados por calor sobre la inmunidad humoral se investigó inmunizando ratones con toxina de cólera y midiendo las concentraciones de los anticuerpos específicos producidos.

Se usó el siguiente protocolo experimental:

1. Se usaron ratones BALB/c de seis a siete semanas, que pesaban 20-30 g.
2. Se distribuyeron los ratones de manera aleatoria en diferentes grupos de tratamiento.
3. Los ratones de control recibieron una dieta a base de leche desnatada en polvo durante todo el experimento.
4. Los ratones del ensayo recibieron 10^9 cfu/día de *L. rhamnosus* HN001 vivo o 10^9 cfu/día de *L. rhamnosus* HN001 muerto por calor al día así como una dieta a base de leche desnatada en polvo durante 14 días.
5. Se inmunizaron por vía oral ratones con toxina de cólera el día 0 y el día 7 de alimentación.

Resultados

La alimentación de *L. rhamnosus* HN001 mejoró significativamente el nivel de actividad fagocítica de los leucocitos

sanguíneos periféricos comparado con ratones que recibieron la dieta de control (Fig 2). Este aumento fue visto con independencia de si se suministraba la *L. rhamnosus* HN001 en la forma viva o matada por calor. No hubo diferencia en el nivel de actividad fagocítica entre los ratones que recibieron *L. rhamnosus* HN001 vivo comparado con *L. rhamnosus* HN001 muerto por calor.

5 La alimentación de *L. rhamnosus* HN001 tanto vivo como muerto indujo un aumento en las respuestas de los anticuerpos tanto en sueros como en mucosas comparado con los ratones de control. Sin embargo, el nivel de respuesta fue significativamente mayor en los ratones alimentados con *L. rhamnosus* HN001 vivo (Tabla 13).

10 Tabla 13 - El efecto de *L. rhamnosus* HN001 vivo y muerto por calor sobre las respuestas de los anticuerpos en sueros y mucosas a Toxina del Cólera en ratones.

Tratamiento	Respuesta de anticuerpos en suero (unidades/ml)	Respuesta de anticuerpos en mucosas(unidades/ml)
Control	88,69 ± 18,52	708,6 ± 146,9
<i>L. rhamnosus</i> HN001 vivo	214,89 ± 62,33*	2.054,5 ± 285,8***
<i>L. rhamnosus</i> HN001 Muerto por Calor	174,89 ± 44,78	1.533,6 ± 319,3

15 Se alimentaron ratones BALB/c con dietas a base de leche y se les administraron por vía oral 10^9 cfu (al día) de *L. rhamnosus* HN001 en forma tanto viva como matada por calor durante 14 días. Los ratones de control no recibieron BAL. Se inmunizaron los ratones por vía oral con Toxina de Cólera los días 0 y 7. Las respuestas de los anticuerpos (suero y secreciones intestinales) se midieron usando un ELISA el día 14. Los valores son media ± error estándar. Diferencias significativas (prueba t de Student) del control: *P=0,05, ***P=0,0005.

20 Estos resultados sugieren que *L. rhamnosus* HN001 tanto vivo como muerto por calor son capaces de mejorar aspectos de la inmunidad natural y adquirida en ratones.

Ejemplo 8 – Propiedades antiinfección de *B. lactis* HN019 y *L. rhamnosus* HN001

25 Los objetos del presente estudio fueron:

1. Valorar la eficacia de la protección de *B. lactis* HN019 y *L. rhamnosus* HN001 frente al patógeno gastrointestinal *Salmonella typhimurium*.

30 2. Determinar el papel de la inmunoestimulación inducida por *B. lactis* HN019 y *L. rhamnosus* HN001 en protección frente a infección por *S. typhimurium* en ratones.

35 Se evaluaron las propiedades antiinfección por medición de traslocaciones bacterianas para el hígado y bazo. Se examinaron los efectos inmunoestimuladores por determinación de la función de los fagocitos (leucocitos sanguíneos periféricos y macrófagos peritoneales) y respuestas proliferativas de los linfocitos a un mitógeno de células T (PHA).

Se usó el siguiente protocolo experimental:

40 1. Se usaron ratones BALB/c de seis a siete semanas, que pesaban 20-30 g.

2. Se distribuyeron los ratones de manera aleatoria en 4 diferentes grupos de tratamiento y se estabularon de manera individual.

45 3. Todos los ratones recibieron una dieta a base de leche desnatada en polvo durante todo el experimento.

4. Los ratones del ensayo comenzaron alimentación diaria de *B. lactis* HN019 o *L. rhamnosus* HN001 (10^9 cfu/día) 7 días antes de exposición y se continuó durante la duración del estudio.

50 5. Se expusieron por vía oral ratones a los que se había administrado *B. lactis* HN019 o *L. rhamnosus* HN001 y un grupo de control (no BAL) a *Salmonella typhimurium* (ATCC 1772) 8×10^5 cfu/día durante 5 días empezando el día 7.

55 6. Un grupo de control no infectado no recibió exposición a *S. typhimurium*.

7. El día 6 después de exposición se usaron los ratones para la medición de la traslocación bacteriana al hígado y bazo y para valoración de la función inmunitaria.

Resultados

60

Los ratones enriquecidos con tanto *B. lactis* HN019 como *L. rhamnosus* HN001 mostraron niveles significativamente menores de traslocación bacteriana en el hígado y bazo que los ratones alimentados con sólo *S. typhimurium* (Fig 3).

5 La infección por exposición dio como resultado una supresión significativa de la función fagocítica (Fig 4); la actividad fagocítica de ratones de control expuestos a *S. typhimurium* fue significativamente menor que la de los ratones no infectados. Sin embargo, la infección con *S. typhimurium* no tuvo efecto sobre la actividad fagocítica de los leucocitos sanguíneos periféricos de ratones enriquecidos con *B. lactis* HN019 o *L. rhamnosus* HN001. Esto se
10 mostró por niveles similares de actividad fagocítica en ratones enriquecidos con *B. lactis* HN019 o *L. rhamnosus* HN001 y expuestos a *S. typhimurium* y los ratones de control no infectados normales.

Los ratones enriquecidos tanto con *B. lactis* HN019 como *L. rhamnosus* HN001 mostraron mayores respuestas proliferativas de linfocitos para PHA que el control expuesto a *S. typhimurium* (Fig 5). No hubo diferencia significativa en la respuesta entre ratones que recibieron *B. lactis* HN019 o *L. rhamnosus* HN001 y los ratones de control no
15 infectados.

Además estos resultados sugieren que el enriquecimiento con *B. lactis* HN019 o *L. rhamnosus* HN001 es capaz de conferir protección frente a patógenos entéricos tales como *Salmonella typhimurium*. La resistencia mejorada a la infección va acompañada de un aumento en realización inmunitaria.
20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un cultivo biológicamente puro de *L. rhamnosus* HN001 AGAL número de depósito NM97/09514 fechado el 18 de agosto de 1.997.
- 10 2. Una composición de un cultivo biológicamente puro de *L. rhamnosus* HN001 AGAL número de depósito NM97/09514 fechado el 18 de agosto de 1.997 en una concentración inmunoestimuladora con un excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable.
- 15 3. Una composición según la reivindicación 2, que contiene *L. rhamnosus* HN001 AGAL número de depósito NM97/09514 fechado el 18 de agosto de 1.997 y uno o más cualesquiera de *L. rhamnosus* HN067 número de depósito NM97/01925 fechado el 11 de febrero de 1.998 y *L. acidophilus* HN017 AGAL número de depósito NM97/09515 fechado el 18 de agosto de 1.997.
- 20 4. Una composición según la reivindicación 2 ó 3, en la que dicho excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable es un alimento o en la que la composición es una composición farmacéutica y dicho excipiente o diluyente es un excipiente o diluyente farmacológicamente aceptable.
- 25 5. Una composición según la reivindicación 4, en la que dicho alimento es uno o más cualesquiera de: leche cultivada, yogur, queso, bebida láctea o polvo lácteo.
6. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en tratamiento.
7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para mejorar la inmunidad natural y adquirida.
8. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la fabricación de un medicamento que mejorar la inmunidad natural y adquirida.

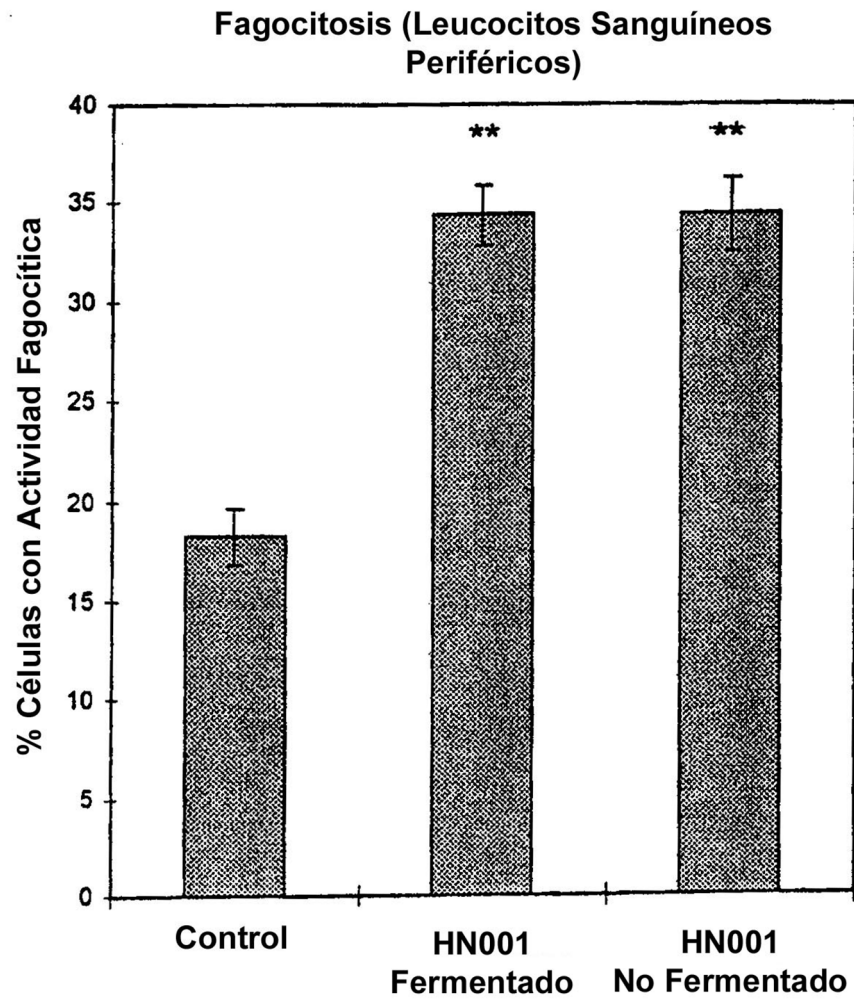


FIG 1

Fagocitosis (Leucocitos Sanguíneos Periféricos)

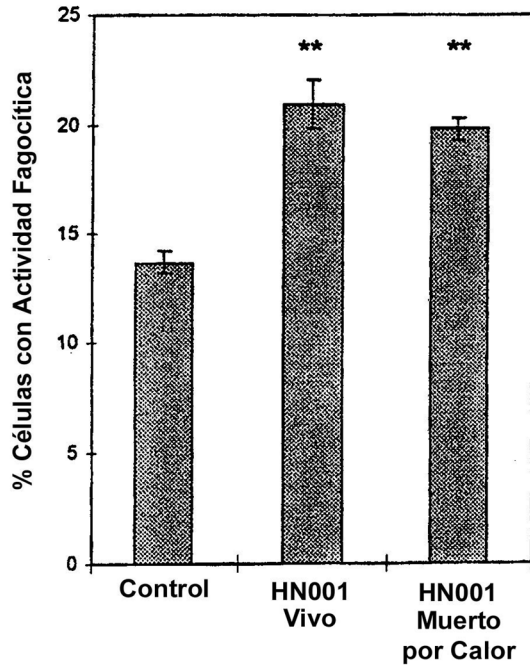


FIG 2

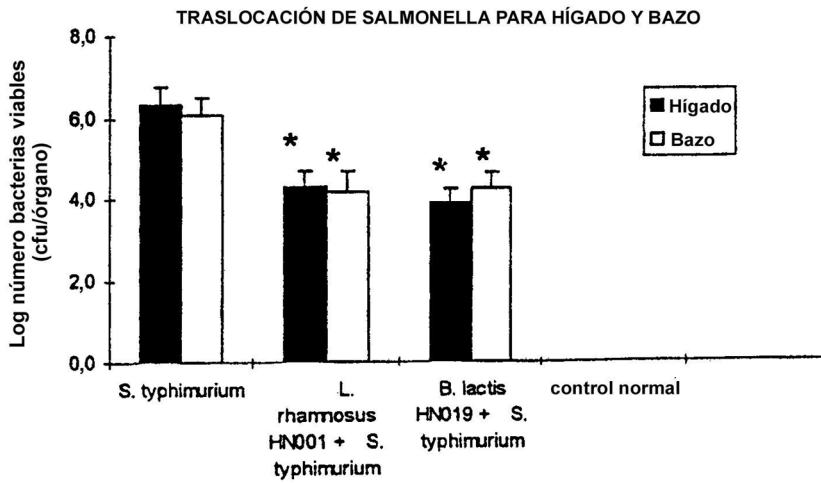


FIG 3

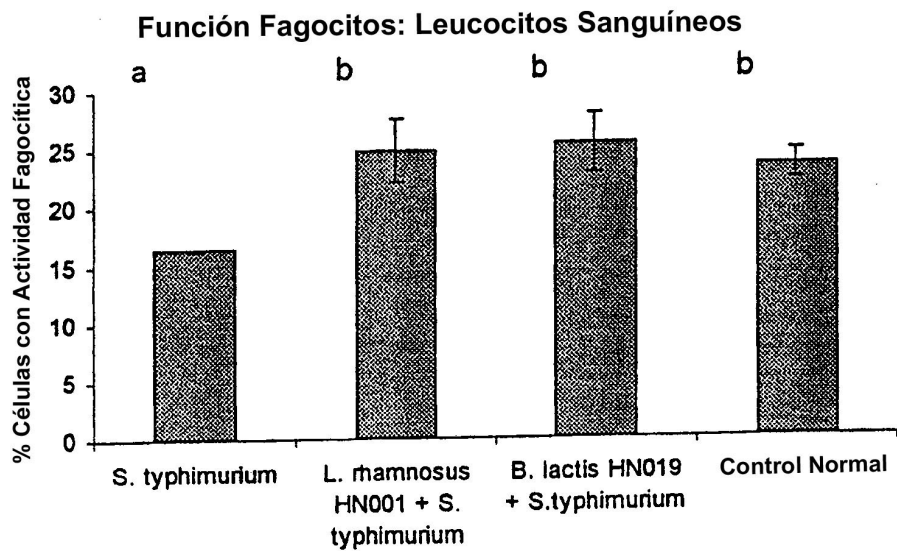


FIG 4

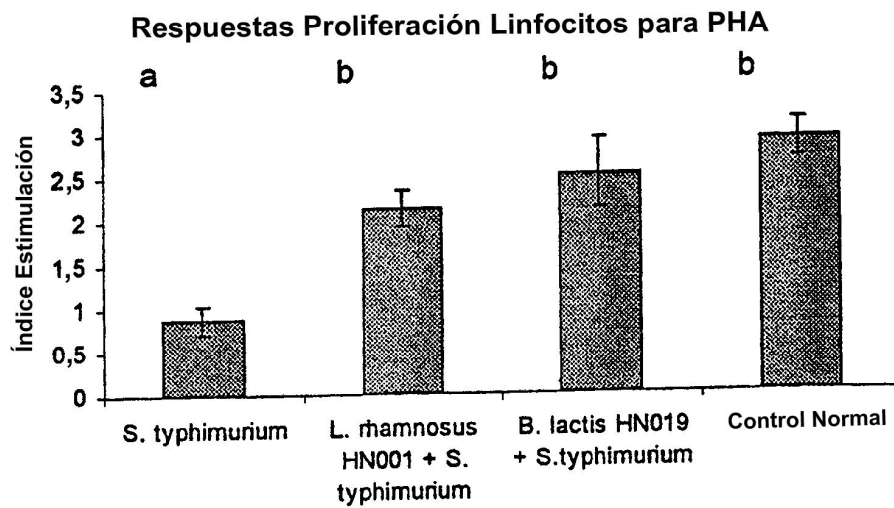


FIG 5