

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 993**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2007** **E 07004329 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012** **EP 1964570**

54 Título: **Composición farmacéutica para la protección frente a alergias y enfermedades inflamatorias**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.04.2013**

73 Titular/es:

**PROTECTIMMUN GMBH (50.0%)**  
**78140 Vélizy Villacoublay**  
**45886 Gelsenkirchen , DE y**  
**FORSCHUNGSZENTRUM BORSTEL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BAUER, JOHANN;**  
**BLÜMER, NICOLE;**  
**BUFE, ALBRECHT;**  
**DEBARRY, JENNIFER;**  
**EGE, MARKUS;**  
**FRIEDRICH, SUSANNE;**  
**GARN, HOLGER;**  
**GATERMANN, SÖREN;**  
**HANUSZKIEWICZ, ANNA;**  
**HEINE, HOLGER;**  
**HOLST, OTTO;**  
**RENZ, HARALD;**  
**VON MUTIUS, ERIKA y**  
**WEGMANN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 399 993 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

Composición farmacéutica para la protección frente a alergias y enfermedades inflamatorias.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica, que contiene bacterias aisladas que se producen de manera natural, no transgénicas, del grupo de *Lactococcus* y *Acinetobacter* o fragmentos de éstas o mezclas de las mismas, a una mezcla de este tipo como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas o alérgicas y a un procedimiento para la producción de esta composición.

Se denominan alergias a las reacciones excesivas del cuerpo, en particular del sistema inmunitario, a sustancias externas no perjudiciales. Estas reacciones transcurren de la misma manera que la respuesta inmunitaria normal contra un germen patógeno. Se distinguen varios tipos de respuesta inmunitaria alérgica. Las reacciones alérgicas de tipo 1, a las que pertenecen asma bronquial, dermatitis atópica, urticaria (sarpullido), alergia al polen así como alergias alimentarias, son las más extendidas. Aunque estas enfermedades presentan síntomas corporales diferentes, éstos se basan en mecanismos inmunológicos similares.

Numerosos estudios demuestran, que las enfermedades alérgicas están aumentando. Las causas de la aparición y el desarrollo de las alergias están poco claras hasta la fecha. Determinados factores hereditarios desconocidos hasta la fecha y condiciones ambientales como exposición a alérgenos, vivir en la ciudad, número de hermanos y algunas infecciones contribuyen probablemente a la aparición.

Las alergias de tipo 1 están mediadas por anticuerpos del grupo E, cuya aparición depende de linfocitos T cooperadores del grupo II. Estas células Th2 aparecen en el caso de alergias con más frecuencia en relación con las células Th1. Los niños nacen al principio con una respuesta inmunitaria Th2 dominante, que se desplaza en el primer año de vida probablemente bajo la influencia de la carga microbiana a una respuesta Th1 dominante (respuesta inmunitaria no alérgica). Se asume, que infecciones frecuentes se correlacionan con una respuesta Th2 menor y con ello con menos alergias. Por tanto, una carga microbiana baja podría conducir a la aparición aumentada de alergias (Hipótesis de la higiene)

Las posibilidades para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas son limitadas. Si bien los síntomas pueden aliviarse relativamente bien mediante numerosos medicamentos, los tratamientos de inmunoterapia como la desensibilización tienen sin embargo un éxito diferente. Por ejemplo en el caso del asma bronquial que aparece con frecuencia este tratamiento es más bien ineficaz. Tampoco es seguro que evitar los alérgenos como medida preventiva contribuya a la disminución de la frecuencia de alergia. En conjunto no hay posibilidades para disminuir el riesgo de aparición de una alergia.

El documento WO 01/49319 describe una composición, que contiene antígenos que se encuentran sobre/en microorganismos y su utilización para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas. Esta composición se produce porque se acumula polvo de establo y, dado el caso, éste se suspende en un disolvente adecuado, por ejemplo agua o solución salina isotónica. Por consiguiente se produce una suspensión de microorganismos o también de fragmentos de estos organismos en un disolvente, que puede administrarse directamente o tras etapas de tratamiento adicionales para el tratamiento de alergias.

El documento EP-A 1 637 147 describe un extracto de polvo de establo para el tratamiento de enfermedades alérgicas, en el que durante el procedimiento de producción completo no tiene lugar ningún aporte de calor, un procedimiento para su producción y el uso de este extracto para la producción de un medicamento para el tratamiento de enfermedades alérgicas.

El documento WO 96/00579 describe un procedimiento de producción para producir una suspensión y un extracto de micobacterias en disolución acuosa, en el que el extracto se calienta al menos 20 minutos hasta 121°C. Esta suspensión o este extracto puede utilizarse para la inmunomodulación inespecífica.

El uso de especies de *Lactococcus* se describe en primera línea para administración oral con fines probióticos (por ejemplo Kimoto *et al.*, Microbiol Immunol. 2004; 48(2):75-82; Perdigon, G. *et al.*, Int J Immunopathol Pharmacol. mayo de 1999; 12(2):97-102; Villamil, L. *et al.*, Clin Diagn Lab Immunol., noviembre de 2002; 9(6):1318-23; Vitini E. *et al.*, Biocell. Diciembre de 2000; 24(3):223-32; Perdigon, G. *et al.* J Diary Sci., junio de 1999; 82(6):1108-14; Huis in't Veld JH., Ned Tijdschr Tandheelkd. Diciembre de 1992; 99(12):467-70), pero también como vehículo para introducir los genes recombinantes, cuya expresión puede atenuar estados patológicos (Cortes-Perez, N. *et al.*, Clin. Vaccine Immunol. Publicado en línea el 3 de enero de 2007; Daniel, C. *et al.*, Allergy, julio de 2006; 61(7):812-9; documento DE-A 101 01 793).

La utilización de *Lactococcus sp.* para la prevención y para el tratamiento de enfermedades también se describe, y concretamente en el caso de administración oral para la prevención y el tratamiento del sobrepeso o la diabetes (documento KR1020010106068), de enfermedades estomacales (documento KR1020040044300) y de artritis reumatoide (documento EP-A 762 881). Una mezcla de antígeno-antitoxina para la producción de una preparación homeopática, cuya aplicación principal se encuentra en el campo de los trastornos cardiovasculares, hipertensión y enfermedades alérgicas, se describe en el documento DE-A 100 07 771.

El objetivo de la presente invención era proporcionar un agente beneficioso para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas y/o enfermedades inflamatorias.

Este objetivo se soluciona mediante una composición farmacéutica para administración nasal o inhalatoria, que contiene bacterias aisladas que se producen de manera natural, no transgénicas, seleccionadas del grupo que consiste en *Lactococcus* y *Acinetobacter* o fragmentos de éstas o una mezcla de éstas y dado el caso un vehículo farmacéuticamente aceptable para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas o alérgicas, seleccionadas de alergias tipo IV o alergias tipo I dependientes de IgE.

Un planteamiento de la presente invención es la utilización de bacterias de las especies *Lactococcus* y/o *Acinetobacter* como organismos que se producen de manera natural, no modificados mediante ingeniería genética, en particular no transgénicos. Un planteamiento adicional es la utilización de las bacterias en forma aislada. Esto significa, que o bien una especie de *Lactococcus*, preferiblemente *Lactococcus lactis*, de manera especialmente preferible *Lactococcus lactis*, cepa G121, y/o bien una especie de *Acinetobacter*, preferiblemente *Acinetobacter lwoffii*, de manera especialmente preferible *Acinetobacter lwoffii*, cepa F28, o bien una mezcla de estas dos especies de bacterias en forma previamente aislada y dado el caso purificada se utilizan en la composición farmacéutica.

Dichas bacterias pueden utilizarse como mezclas también directamente como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas o alérgicas, seleccionadas de alergias tipo IV o alergias tipo I dependientes de IgE y enfermedades autoinmunitarias o enfermedades de la piel inflamatorias crónicas.

En una forma de realización adicional de la invención se utilizan fragmentos de estas bacterias. En el sentido de esta invención por fragmentos deben entenderse preferiblemente trozos de membrana y componentes de membrana, proteínas de la pared celular, en particular proteínas glicosiladas, polisacáridos, lipopolisacáridos (endotoxinas), proteínas citosólicas, moléculas separadas de las bacterias y/o compuestos y/o metabolitos, ácidos nucleicos y/u orgánulos. Los fragmentos de las bacterias también pueden utilizarse al mismo tiempo con bacterias enteras de la misma o de la otra especie, es decir mezclados con éstas, o pueden utilizarse bacterias enteras de una especie y fragmentos de la otra especie.

Las bacterias (no fragmentadas) pueden usarse en estado vivo o como bacterias muertas como medicamento o utilizarse en la composición farmacéutica. Dado que dichas bacterias son completamente inocuas incluso para organismos mamíferos, una utilización en estado vivo es poco problemática y corresponde a una forma de realización preferida de la invención. Para evitar una contaminación de la composición farmacéutica con otros microorganismos, no tan inocuos, también puede aplicarse fácilmente un método de esterilización, como por ejemplo la esterilización en autoclave, el calentamiento o la esterilización sencilla, la utilización de bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas, fungistáticos, viricidas y/o viroestáticos, irradiación con UV o el uso de disolventes, que no pueden tolerar las bacterias, como por ejemplo alcoholes, en particular etanol, propanol, isopropanol, etc., liofilización o esterilización en frío.

Una ventaja especial de la presente invención es la elevada eficacia sencillamente por medio de la administración de la mezcla según la invención. La administración puede tener lugar por vía oral, por vía nasal, por vía conjuntival, por vía inhalatoria, por vía subcutánea, por vía intraarticular, por vía intraperitoneal, por vía rectal o por vía vaginal. Se prefiere la administración nasal o inhalatoria.

Una composición farmacéutica según la invención puede presentarse como aerosol, disolución, preferiblemente disolución acuosa o disolución acuosa alcohólica, suspensión, liofilizado o polvo. Todas estas formas de realización se adecuan especialmente bien para la administración nasal, oral o inhalatoria de las bacterias y/o fragmentos de las mismas.

Un aerosol según la invención está compuesto preferiblemente por pequeñas partículas sólidas o líquidas, que pueden generarse mediante un inhalador, un nebulizador o un aparato de respiración artificial. Las partículas de aerosol pueden estar compuestas por la composición sola o por la composición en combinación con un material de vehículo adecuado. El aerosol por ejemplo puede tener un tamaño de partícula de hasta 100 µm para la aplicación nasal por instilación. Para una aplicación inhalatoria el aerosol puede contener por ejemplo partículas de un tamaño de partícula de hasta 10 µm, preferiblemente inferior a 5 µm.

Una disolución según la invención, que contiene por ejemplo fragmentos solubles de dichas bacterias, puede ser preferiblemente una disolución acuosa o una disolución acuosa alcohólica, por ejemplo una mezcla de agua o una disolución acuosa con etanol, propanol o isopropanol. La disolución puede estar por ejemplo tamponada o ser salina, preferiblemente isotónica, es decir contener moléculas tampón o una concentración de sales fisiológica. La disolución puede contener además excipientes o aditivos inocuos, por ejemplo sintéticos o naturales, tales como conservantes, estabilizadores, aromatizantes y saborizantes, por ejemplo azúcares, vehículos farmacéuticamente inocuos, emulsionantes, diluyentes y si se desea colorantes inocuos.

En el caso de la aplicación de bacterias enteras o componentes y fragmentos insolubles de éstas, pueden estar presentes en forma de una suspensión. Para la suspensión puede usarse una disolución, como se describe anteriormente o cualquier otro medio de suspensión adecuado.

Las bacterias también pueden estar presentes en forma de un liofilizado, o procesarse para dar un polvo o incorporarse a un polvo que puede administrarse farmacéuticamente. Un liofilizado o polvo de este tipo puede mezclarse con componentes farmacéuticamente aceptables adicionales, en particular dado que puede administrarse a través de un inhalador de polvo.

En una forma de realización preferida adicional de la invención se usa una mezcla de especies de *Lactococcus* y *Acinetobacter*, preferiblemente una mezcla de las especies y/o cepas mencionadas anteriormente como medicamento o se utilizan en una composición farmacéutica. En el caso de esta forma de realización la razón de mezclado de las especies bacterianas utilizadas *Lactococcus:Acinetobacter* asciende a desde 5:95 hasta 95:5, preferiblemente de 40:60 a 60:40, de manera especialmente preferida 50:50. Las razones deben entenderse como datos aproximados.

En una forma de realización adicional de la invención también pueden utilizarse bacterias *Lactococcus* y/o *Acinetobacter* en combinación con una o varias especies de las siguientes especies bacterianas: *Micrococcus* spp., *Planococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Aerococcus* spp., *Gemella* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Micromonospora* spp., *Lactobacillus* spp., *Listeria* spp., *Erysipelothrix* spp., *Acinetobacter* spp., *Leuconostoc* spp., *Corynebacterium* spp., *Clavibacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Arthrobacter* spp., *Curtobacterium* spp., *Microbacterium* spp., *Aureobacterium* spp., *Cellulomonas* spp., *Agromyces* spp., *Eubacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Xantomonas* spp., *Frateriella* spp., *Zoogloea* spp., *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Pantoea* spp., *Erwinia* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Actinomyces* spp., *Streptomyces* spp., *Nocardia* spp., *Mycobacterium* spp., *Absidia* spp., *Wallemia* spp., *Eurotium* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Cephalosporium* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Trichoderma* spp., o en combinación con tricotecenos, fumonisinas, gliotoxina, ocratoxinas, patulina, aflatoxinas.

Una ventaja especial del uso de las bacterias mencionadas en el presente documento es, debido a su propia inocuidad, que puede realizarse a una prevención o un tratamiento especialmente beneficioso. Dichas bacterias son ubicuas en el entorno y no se conoce ninguna influencia negativa sobre el bienestar corporal o sobre la salud. Con la utilización de las bacterias antes de la aparición de una enfermedad inflamatoria o alérgica puede prevenirse una enfermedad de este tipo, o atenuarse la virulencia del brote. Esto se denomina en general "prevención". Con el uso según la invención de dichas bacterias puede realizarse una prevención de este tipo o también un tratamiento ya en el periodo de lactancia, o una prevención ya en el seno materno mediante la administración a mujeres embarazadas. En particular mediante el conocimiento de una predisposición familiar para alergias o enfermedades inflamatorias (crónicas) se prefiere especialmente la presente posibilidad beneficiosa de prevención y de tratamiento.

La presente invención es adecuada para influir en particular sobre el sistema inmunitario aún no expuesto (sin exposición) y el infantil. Por tanto la composición o el medicamento según la invención puede administrarse en repetidas ocasiones a mujeres embarazadas, lactantes y niños en los primeros años de vida. Preferiblemente se administra la composición o el medicamento a mujeres embarazadas, lactantes o niños, que debido a una anamnesis familiar positiva presentan un riesgo claramente más alto de desarrollar una enfermedad alérgica. Puede suponerse una anamnesis familiar positiva cuando al menos un progenitor y/o al menos un hermano u otro familiar cercano ya padezca una enfermedad inflamatoria crónica o alérgica o muestre sus síntomas.

La composición o el medicamento según la invención también puede utilizarse para el tratamiento de mujeres embarazadas, lactantes y niños, que ya presentan los primeros signos de una enfermedad inflamatoria crónica o alérgica. Un riesgo más alto para una enfermedad también puede comprobarse genéticamente.

El medicamento o la composición puede administrarse para el tratamiento o la prevención de niños y adultos. De manera especialmente preferida puede administrarse el medicamento o la composición para la prevención a mujeres embarazadas, lactantes o niños, en particular en los primeros años de vida, preferiblemente en los primeros 5 años de vida, de manera especialmente preferida en los primeros 2 años de vida.

La composición se administra preferiblemente con un inhalador, atomizador, nebulizador o aparato de respiración artificial habitual. Puede administrarse en intervalos regulares a lo largo de un periodo largo, para provocar una estimulación continuada en el organismo. La composición puede administrarse por ejemplo hasta los 10 años de 1 a 21 veces por semana, preferiblemente de 7 a 14 veces por semana. A este respecto por cada tratamiento puede tener lugar una aplicación sencilla (por ejemplo mediante la inyección por medio de un atomizador en la nariz), o por ejemplo en una respiración más larga. En el último caso mencionado la duración de cada tratamiento puede encontrarse entre 1 y 120 min., preferiblemente entre 5 y 60 min.

Enfermedades, que pueden prevenirse de esta manera beneficiosa e inocua, o que pueden tratarse de esta manera, son enfermedades inflamatorias crónicas o alérgicas, seleccionadas de alergias tipo IV o alergias tipo I dependientes de IgE y enfermedades autoinmunitarias o enfermedades de la piel inflamatorias crónicas, por ejemplo alergia al polen, alergias alimentarias, asma, neurodermatitis, dermatitis atópica, eccema por contacto, psoriasis, diabetes tipo 1 y 2, esclerosis múltiple, colagenosis, artritis reumatoide, enfermedades tiroideas como tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves.

Para la composición farmacéutica según la invención o el uso de dichas bacterias como medicamento el origen de las bacterias no desempeña ningún papel. Las bacterias pueden aislarse a partir de una fuente natural como hierba, heno, polvo doméstico, polvo de establo, alimentos o similares, dado el caso purificarse y hacerse crecer en cultivo, o pueden adquirirse comercialmente como cultivos individuales.

## 5 Procedimiento de producción

Para la producción de una composición farmacéutica según la invención se aíslan bacterias *Lactococcus* y/o bacterias *Acinetobacter*, preferiblemente *Lactococcus lactis* y/o *Acinetobacter lwoffii*, de manera especialmente preferida *Lactococcus lactis*, G121 y/o *Acinetobacter lwoffii* F78 de una fuente natural o se obtienen comercialmente y se hacen crecer en cultivo. Por ejemplo pueden aislarse las bacterias a partir de polvo de establo y cultivarse en condiciones de cultivo adecuadas, como se representa en el ejemplo 1.

Tras recoger las bacterias éstas pueden llevarse o bien directamente a un medio acuoso o acuoso alcohólico, para obtener una suspensión bacteriana, o bien pueden pasar previamente por una etapa de fragmentación. Los expertos en este campo conocen procedimientos adecuados para la fragmentación y comprenden por ejemplo procedimientos de lisis química, presión/relajación (por ejemplo con el uso de la denominada prensa francesa), procedimientos mecánicos o ultrasonidos, por mencionar algunos procedimientos de rotura. A continuación de esto puede tener lugar también un procedimiento de purificación específico, por ejemplo cuando algunos componentes celulares no se desean en la composición farmacéutica. Por ejemplo pueden separarse de manera selectiva ácidos nucleicos.

Alternativamente a la fragmentación, o también de manera complementaria a ésta puede realizarse una etapa, que provoca la muerte de las bacterias. Para ello puede usarse cualquier procedimiento conocido y adecuado, como por ejemplo esterilización en autoclave, esterilización, aplicación de calor, radiación (UV, radiactiva), la utilización de bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas, fungistáticos, viricidas y/o viroestáticos, o el uso de disolventes, que no pueden tolerar las bacterias, como por ejemplo alcoholes, en particular etanol, propanol, isopropanol, etc. o una esterilización en frío.

Las bacterias vivas o muertas obtenidas a partir de las etapas mencionadas anteriormente o los fragmentos obtenidos de éstas pueden usarse directamente como medicamento, incorporados en el mismo, o mezclarse con (unos) vehículo(s) y agente(s) auxiliar(es) farmacéutico(s), para proporcionarlos en forma de un aerosol, una disolución o una suspensión.

Una etapa de procedimiento especialmente preferida, que puede realizarse de manera opcional, es el secado o la liofilización (secado por congelación) de las bacterias vivas o muertas o de los fragmentos obtenidos de las mismas. Durante la liofilización también pueden añadirse para la estabilización por ejemplo sacarosa, dextrano o glicerina. El producto seco o liofilizado así generado puede utilizarse entonces directamente como medicamento o mezclarse con agentes auxiliares farmacéuticamente tolerables y por ejemplo procesarse para dar un polvo inhalable.

El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser agua, una solución salina o tampón, preferiblemente una solución de cloruro de sodio fisiológica, un alcohol o una mezcla acuosa alcohólica, o un polvo farmacéuticamente aceptable, tal como por ejemplo un silicato finamente molido, almidón, celulosa y derivados de celulosa y muchos más. La aplicación tiene lugar entre otros como aerosol por medio de un nebulizador o atomizador, un aerosol de gas comprimido por medio de un "generador con orificio vibratorio" o un "generador con disco giratorio" o una inhalación de polvo por medio de sistemas de atomización de uso común como de boquilla única o doble.

## 40 Figuras:

Figura 1: Tratamiento intranasal con *L. lactis* G121 y *A. lwoffii* F78 mejora la reactividad de las vías respiratorias frente a metacolina en ratones alérgicos. Los ratones se trataron como se describe más adelante en 2.2. Se analizó la función pulmonar tal como se describe. Se indica una diferencia significativa media ( $\pm$ DE) de la concentración de metacolina, que provocó una reducción del 50% del flujo de aire espirado medio (MCH<sub>50</sub>) en ocho ratones por grupo. Se señalan diferencias significativas con  $p < 0,05$  mediante un \*

Figura 2: Inhibición de la infiltración de eosinófilos mediante tratamiento i.n. de ratones con *L. lactis* G121 y *A. lwoffii* F78. Se trataron por vía i.n. grupos de ratones (en cada caso  $n=6$ ) o bien con PBS, *L. lactis* G121 o *A. lwoffii* F78, se sensibilizaron y se expusieron a OVA, o bien permanecieron insensibilizados/sin OVA, tal como se describe en 2.3. El número de eosinófilos, linfocitos, macrófagos y neutrófilos se analizó en el LBA mediante determinación microscópica. Los resultados se representan como diferencia significativa media ( $\pm$ DE). Diferencias significativas con respecto al grupo control no sensibilizado tratado con PBS se señalan mediante #, con respecto al grupo sensibilizado tratado con PBS mediante un \* con  $p < 0,05$  (#, \*),  $p < 0,01$  (##, \*\*) o  $p < 0,001$  (\*\*\*).

Figura 3: Patrón de citocina inducida por bacterias en CDmo humanas. (A) Se estimularon CDmo humanas durante la duración indicada en cada caso con LPS (10 ng/ml (círculos)), con *L. lactis* G121 vivas ( $10^6$  ufc/ml, (triángulos)) y *A. lwoffii* F78 vivas ( $10^6$  ufc/ml, (cuadrados)). Se determinó el ARNm de IL-12p40 y TNF- $\alpha$  en relación con HPRT mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los datos representan una media de tres experimentos independientes con CDmo a partir de distintos donantes sanos. (B) Tratamiento de CDmo humanas con LPS y cantidades

crecientes de bacterias inactivadas por calor. La liberación de IL-12p70 y TNF- $\alpha$  se midió tras 24 horas de incubación en sobrenadante de cultivo.

Figura 4: Ambas especies de bacterias inducen una expresión de los ligandos Notch que polariza T<sub>H</sub>1 en CDmo humanas. Se estimularon las CDmo humanas durante la duración indicada con LPS (10 ng/ml (círculos)), con *L. lactis* G121 vivas (10<sup>6</sup> ufc/ml, (triángulos)) y *A. lwoffii* F78 vivas (10<sup>6</sup> ufc/ml, (cuadrados)). Se midió ARNm de jagged-1 y delta-4 aplicando la PCR cuantitativa en tiempo real y se representan los datos como cantidades de ARNm de ambos genes en relación con HPRT. Los datos representan una media de tres experimentos independientes con CDmo a partir de distintos donantes sanos.

#### Ejemplos:

##### Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de las cepas:

Se aislaron las cepas bacterianas *L. lactis* G121 y *A. lwoffii* F78 tras el cultivo de muestras de polvo, que fueron recogidas de establos de Baviera, Alemania, y se cultivaron adicionalmente. Se cultivó *Acinetobacter lwoffii* F78 en medio SB (10 g de Mops, 20 g de extracto de levadura, 30 g de triptona en 1 litro, tras completarse la esterilización en autoclave con 10 ml de glucosa 2 M) y *Lactococcus lactis* G121 en medio TSB, que contenía extracto de levadura al 0,3%. Las condiciones de cultivo para ambas cepas fueron 30°C hasta la densidad celular deseada (dentro de la fase logarítmica).

La caracterización de las cepas se realizó con la ayuda de una PCR específica para la secuenciación del ADNr 16S. Se seleccionaron los cebadores de PCR a base de regiones conservadas de *A. lwoffii* F78 y *L. lactis* G121. Para la amplificación del ADNr 16S se traspasaron colonias individuales a un recipiente de PCR, mezcladas con mezcla de reacción de PCR (35  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l de 10x tampón de PCR Advantage 2 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia), 2,5  $\mu$ l de cada disolución de cebador (concentración final 10  $\mu$ M/ml), 1  $\mu$ l de cada dNTP (conjunto de dNTP de calidad para PCR; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y 1  $\mu$ l de 50x mezcla de polimerasa Advantage 2 (Clontech)). Se realizó la PCR con las siguientes condiciones: 1 min. a 95°C, seguido de 40 (*A. lwoffii*) o 30 (*L. lactis*) ciclos con 20 s a 95°C, 30 s a 60°C y 1,5 min. a 72°C. Se finalizaron las reacciones con una última etapa de llenado a 72°C durante 7 min. Se analizaron los productos de amplificación sobre un gel de agarosa al 2%, se aislaron a partir del gel y se purificaron (kit de purificación de PCR Qiaquick, Qiagen, Hilden, Alemania) y se secuenciaron. Los cebadores usados pueden tomarse de la tabla 1. Los cebadores 1, 2, 5 y 6 son cebadores de PCR, los cebadores 3, 4 y 7 a 10 cebadores de secuenciación.

Tabla 1

Número	Cebador	Secuencia (5'→3')
1	5 Aci 16S	ACACATGCAAGTCGAG
2	3 Aci 16S	CTACTTCTGGTGCAACA
3	Aci 16S	CCTAATACATGCAAGT
4	Aci 16S	GCTACCTTGTTACGACT
5	5 Lacto 16S	ACCGGCTAACTCTGTG
6	3 Lacto 16S	TTCACCGCTACACCTGG
7	Lacto SeqPri	TGCATTGGAACTGGT
8	Lacto SeqPri	GTGCATGGTTGTCTGCA
9	Lacto SeqPri	GGAATAGCACGAGTAT
10	Lacto SeqPri	TCAGTTACAGGCCAGA

##### Ejemplo 2: Eficacia *in vivo*

Se determina *in vivo* la potencia protectora total de la composición según la invención mediante estudios de función inmunológicos y de biología celular en un modelo animal normalizado de ratón.

A continuación se describen en primer lugar los métodos para la sensibilización y la inducción de asma alérgica en ratones con ovoalbúmina, para el tratamiento con bacterias *Lactococcus* y/o *Acinetobacter* y para el análisis de las reacciones inflamatorias y alérgicas.

**2.1. Sensibilización e inducción de asma alérgica en ratones con ovoalbúmina (OVA)-** Para la sensibilización de ratones frente al alérgeno modelo ovoalbúmina se usa hidróxido de aluminio (Pierce) como adyuvante. De este adyuvante se conoce, que desencadena respuestas inmunitarias, que se caracterizan por la producción de citocinas

tales como IL-4, IL-5 y IL-13 y por la producción de anticuerpos del isotipo IgE e IgG1 (el isotipo correspondiente en seres humanos es IgG4).

La sensibilización de ratones de desde seis hasta ocho semanas de edad de la cepa consanguínea Balb/c tiene lugar mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de 10 µg de ovoalbúmina (calidad V de la empresa Sigma) y 1,5 mg de hidróxido de aluminio en un volumen total de 200 µl de tampón (PBS). En total la inyección tiene lugar tres veces, es decir en el día 0, en el día 14 y en el día 21.

Para provocar posteriormente una reacción alérgica en los pulmones de los ratones, es decir desencadenar asma alérgica aguda, se tratan los ratones en el día 22, 27 y día 28 en cada caso durante 20 minutos con aerosol de ovoalbúmina. Para ello se ponen los ratones en una cámara de plexiglás con 11 litros de volumen. A la cámara se conecta un inhalador de la empresa Pari, que previamente se llenó con disolución de ovoalbúmina al 1%, y se hace funcionar con un generador de aerosol Pari-Boy-Turbo. Tras la segunda aplicación del aerosol de OVA pueden diagnosticarse en los ratones durante algunos días síntomas del asma alérgica aguda. A los síntomas pertenecen:

- 1) la reacción aumentada frente a metacolina, la hiperreactividad bronquial
- 2) la infiltración aumentada de granulocitos eosinófilos y linfocitos en la luz de las vías respiratorias
- 3) la producción de anticuerpos específicos de ovoalbúmina de los isotipos IgE e IgG1
- 4) la producción de interleucina 5 tras reestimulación *in vitro* de linfocitos con ovoalbúmina.

Los métodos para la medición de los parámetros individuales se explican a continuación más detalladamente.

**2.2. Medición de la hiperreactividad bronquial** - Un parámetro de diagnóstico determinante, que se mide en seres humanos, para diagnosticar con seguridad una enfermedad asmática alérgica, es la hiperreactividad bronquial. A este respecto se trata de una hipersensibilidad de la musculatura lisa de los bronquios frente a irritaciones inespecíficas. Para el diagnóstico en el ser humano se aplican concentraciones reducidas de histamina y posteriormente se mide la resistencia de las vías respiratorias en un pletismógrafo. Las personas asmáticas muestran una broncoconstricción más intensa dependiente de la concentración de histamina y por consiguiente una resistencia de las vías respiratorias más elevada que las personas sanas.

La medición en ratones tiene lugar de manera muy parecida. Para la medición se ponen los ratones en un pletismógrafo de la empresa Buxco en las cámaras previstas para ello. A través de las cámaras fluye un flujo de aire continuo y un medidor de presión altamente sensible registra variaciones de la presión repentinas en la cámara. La inspiración de los ratones genera una presión negativa y la espiración una presión positiva en la cámara. Estos cambios de presión se registran de manera continua en función del tiempo y a partir de los valores medidos el software calcula para cada ciclo respiratorio el denominado valor Penh. Este valor adimensional se correlaciona con la resistencia de las vías respiratorias. En ratones hiperreactivos aumenta la resistencia de las vías respiratorias en función de la concentración de metacolina (en ratones se toma en lugar de histamina, metacolina para la estimulación, dado que los bronquios de los ratones no reaccionan a la histamina), lo que se expresa mediante un aumento del valor Penh.

La medición de la hiperreactividad bronquial tiene lugar 24 horas tras la última exposición al aerosol de OVA. Para la medición de la hiperreactividad bronquial se ponen los ratones en contacto tras un tiempo de aclimatación de 10 minutos en pletismógrafo durante 7 minutos con aerosol de PBS y a este respecto se registra el valor Penh. A continuación tiene lugar la exposición en cada caso durante 7 minutos con concentraciones crecientes de metacolina: 6, 12, 25, 50 mg/ml. Durante cada exposición se mide de manera continua el valor Penh y se promedia en periodos de 30 segundos. El periodo en el que para una concentración de metacolina determinada se alcanza el valor Penh máximo, se representa entonces frente a la concentración de metacolina. De esto resulta una curva dosis-respuesta, cuya área bajo la curva es mayor, cuanto más intensamente reaccionen los ratones a la metacolina. El área bajo la curva se correlaciona por tanto con la hiperreactividad de los animales y se usa para valoración estadística.

**2.3. Estudio de la composición celular del lavado broncoalveolar (LBA)** - En los sujetos de experimentación sanos o ratones no tratados sólo pueden observarse de muy pocos a ningún granulocito eosinófilo en el tejido pulmonar y en la luz de las vías respiratorias. Los leucocitos, que se encuentran en las vías respiratorias sanas, son fundamentalmente macrófagos. En relación con el asma alérgica, por motivos aún no aclarados totalmente, se produce la infiltración masiva de las vías respiratorias por granulocitos eosinófilos y en menor medida por linfocitos.

Para estudiar la composición del infiltrado de leucocitos en las vías respiratorias de ratones, se sacrifican éstos tres días tras la última exposición al aerosol de OVA. Se deja al descubierto la tráquea y se inserta una cánula permanente venosa 24G en la tráquea. Mediante ésta se lava la luz de las vías respiratorias dos veces con en cada caso 1 ml de tampón isotónico (lavado broncoalveolar). El número total de las células, que se extraen por lavado de esta manera de los pulmones, se cuenta microscópicamente por medio de la cámara de recuento Neubauer. A continuación se centrifugan los leucocitos del LBA con una citocentrífuga de la empresa Shandon sobre portaobjetos. La coloración de las células tiene lugar entonces con el kit de coloración rápida HAEME de la empresa

Labor+Technik Eberhard Lehmann, tal como se describe en el anexo del producto. Tras llevarse a cabo la coloración se realiza un recuento microscópico de 300 células sobre el portaobjetos y se clasifican según los criterios de uso común en las distintas subpoblaciones de leucocitos. Posteriormente puede calcularse la composición porcentual del LBA.

- 5     **2.4. Medición de anticuerpos específicos de OVA del isotipo IgE e IgG1** - La sensibilización frente a un alérgeno puede medirse mediante la determinación de anticuerpos específicos de alérgenos de las clases IgG1 e IgE. La cuantificación de los anticuerpos específicos de alérgeno en el suero de ratones tiene lugar por medio de ELISA indirecto. Para ello se extrae sangre de la vena de la cola de los ratones dos días tras la última aplicación de aerosol de OVA. Tras la coagulación de la sangre se obtiene el suero mediante centrifugación y se utiliza en el ELISA:
- 10    **Instrucciones breves para el ELISA:**  
 ELISA de IgE (específica de OVA):
- recubrir placas con OVA 5 µg/ml en tampón de recubrimiento, en cada caso 100 µl por depósito (durante la noche)
  - lavar 3x, en cada caso 250 µl por depósito
  - recubrir posteriormente con BSA al 1% en tampón de lavado, 250 µl por depósito, 1 hora
- 15    - lavar 3x
- poner diluciones de suero en tampón de lavado 1/3, 1/10 y 1/30, 100 µl por depósito, 1 hora
  - lavar 3x
  - poner anticuerpo anti-IgE biotinilado (Pharmingen, R35-72) diluido 1/100 en tampón de lavado, 100 µl por depósito, 1 hora
- 20    - lavar 3x
- poner Extravidin-POD (Sigma) diluido 1/1000 en tampón de lavado, 100 µl por depósito, 1 hora
  - lavar 3x
  - poner disolución de sustrato TMB, 100 µl por depósito, 30 min.
- 25    - detener la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 1 M por depósito, puede medirse la placa a una longitud de onda de 450 nm
- ELISA de IgG1 (específica de OVA):
- recubrir placas con OVA 5 µg/ml en tampón de recubrimiento, en cada caso 100 µl por depósito (durante la noche)
  - lavar 3x, en cada caso 250 µl por depósito
  - recubrir posteriormente con MMP al 5% en tampón de lavado, 250 µl por depósito, 1 hora
- 30    - lavar 3x
- poner diluciones de suero en tampón de dilución 1/100, 1/300, 1/1000 y 1/3000, 100 µl por depósito, 1 hora
  - lavar 3x
  - poner anticuerpo anti-IgG1 conjugado con AKP (Pharmingen, X56) diluido 1/1000 en tampón de dilución, 100 µl por depósito, 1 hora
- 35    - lavar 3x
- poner disolución de sustrato pNPP, 100 µl por depósito, 30 min.
  - detener la reacción con 50 µl de solución cáustica 1 M por depósito, puede medirse la placa a una longitud de onda de 405 nm.
- 40    En cada placa de ELISA se lleva a cabo una serie de diluciones de un suero patrón. En este suero patrón se encuentra una concentración conocida de anticuerpos específicos de OVA del isotipo IgG1 e IgE. Mediante la comparación de valores de medición de suero de ratón con concentración desconocida de IgG1 e IgE específica de OVA con la serie de medición del suero de ratón conocido, puede calcularse la concentración en la muestra desconocida.



**2.5. Tratamiento de ratones con *Lactococcus lactis* y *Acinetobacter lwoffii* durante la sensibilización:** Para el tratamiento de ratones con las dos cepas bacterianas *Lactococcus lactis* G121 o *Acinetobacter lwoffii* F78 se les administran en cada caso en estado anestesiado por vía intranasal  $10^6$  ufc de bacterias liofilizadas, o PBS como control, cada segundo día, empezando 10 días antes de la primera sensibilización, a lo largo del periodo de tiempo completo de la fase de sensibilización y de inicio (véase anteriormente: "Sensibilización e inducción de asma alérgica en ratones con ovoalbúmina (OVA)").

**2.6. Formación y estimulación de células dendrítica humanas derivadas de monocitos (CDmo):** Se produjo sangre heparinizada de donantes sanos con ayuda del método de separación de Ficoll (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) y se obtuvieron las células mononucleares periféricas (CMSP). A continuación se aislaron los monocitos mediante elutriación centrífuga a contracorriente. Entonces se produjeron las CDmo tal como se describe en Sallusto y Lanzavecchia, J. Exp. Med. 1994; 179:1109-1119. Resumiendo brevemente, este procedimiento puede representarse tal como sigue. se cultivaron monocitos (pureza del 95%) con  $10^6$  células/ml en RPMI 1640 (Cambrex, East Rutherford, EE.UU.), complementado con suero bovino fetal al 10% inactivado por calor (Biochrom AG, Berlín, Alemania), penicilina 100 U/ml (PAA Laboratories GmbH), estreptomycin 100 µg/ml (PAA Laboratories GmbH), GM-CSF 500 U/ml (Strathmann Biotec GmbH, Hamburgo, Alemania) y IL-4 500 U/ml ((Strathmann Biotec GmbH), cambiándose la mitad del medio inclusive las citocinas cada 2 a 3 días. En el día 7 se recogieron las células y se cultivaron adicionalmente en un medio completo con una densidad de  $10^6$  células/ml en placas de 24 pocillos. Las células o bien se dejaron sin tratar o bien se trataron con LPS 10 ng/ml de *Salmonella enterica* sv. Friedenau o  $10^6$  ufc/ml de *L. lactis* G121 o de *A. lwoffii* F78.

**2.7. Expresión de moléculas coestimulantes en CDmo humanas** - Tras 24 horas de incubación con los estímulos indicados en 2.6 se recogieron las células y se pusieron en contacto con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo (Acm) para CD40, CD80, CD86 o MHC clase II y se fijaron con para-formaldehído al 1,5%. Los Acm para CD40-PE y CD80-PE, MHC clase II-PE, IgG1- e IgG2a-PE se compraron a BeckmannCoulter (Fullerton, EE.UU.), el Acm de CD86-PE se adquirió de BD PharMingen (San Diego, EE.UU.). Se analizaron las células mediante la citometría de flujo en un FACSCalibur y la aplicación del programa CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, EE.UU.).

**2.8. PCR cuantitativa en tiempo real:** Tras 3, 6 y 12 horas de incubación con los estímulos mencionados anteriormente se aisló el ARN total usando el kit de ARN Absolutly de Stratagene de las CDmo y se transcribió se manera inversa a ADNc usando Oligo(dT)<sub>12-18</sub> y transcriptasa inversa Superscript (Invitrogen). Se cuantificaron los transcritos mediante PCR cuantitativa en tiempo real en un LightCycler 2.0 con el kit FastStart ADN Master Plus SYBR Green (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Para cada muestra se normalizó el ARNm específico aparecido a la cantidad de ARNm de HPRT y se expusieron en unidades seleccionadas libremente. Se realizaron las PCR en tiempo real con los cebadores, que se exponen en la siguiente tabla 2:

Tabla 2

Cebador	Secuencia (5'→3')
HPRT-for	GTCAGGCAGTATAATC
HPRT-rev	GGGCATATCCTACAAC
TNF $\alpha$ -for	CCTGTAGCCCATGTTGT
TNF $\alpha$ -rev	TTGAAGAGGACCTGGG
IL-12p40-for	AAAGGAAGATGGAATT
IL-12p40-rev	TGCTGCTTTTGACACTG
delta-4-for	GGCCTGTTTTGTGACCA
delta-4-rev	CGACAGGTGCAGGTGT
jagged-1-for	CTGGCGGCTGGGAAGG
jagged-1-rev	GAGGGCTGCAGTCATT

### Ejemplo 3: Resultados de los ensayos in vivo

**3.1. Síntomas de asma** – El ensayo que va más lejos para comprobar el efecto biológico de las bacterias como medicamento o en una composición farmacéutica según la invención es el estudio de los síntomas de asma desencadenados por alergia en los ratones. La figura 1 muestra que puede lograrse una clara mejora de la actividad respiratoria en ratones asmáticos mediante el tratamiento con las bacterias *Lactococcus lactis* G121 y *Acinetobacter lwoffii* F78, y que una concentración de metacolina, que provocó una reducción del 50% del flujo de aire espirado

medio ( $MCH_{50}$ ) en ocho ratones por grupo, se encuentra incluso por encima del nivel de ratones no tratados sin asma.

**3.2. Inflamación en los bronquios** - En ratones con asma las células eosinófilas reflejan en los bronquios el estado de una inflamación asmática. La figura 2 demuestra que mediante el tratamiento de los ratones con las bacterias *L. lactis* G121 y *A. lwoffii* F78 el número de células eosinófilas, que es muy elevado en ratones enfermos y están ausentes en el caso normal, disminuye mucho y sólo se encuentran de manera insignificante.

**3.3. Sensibilización alérgica** - Los síntomas asmáticos se desencadenan en los ratones mediante sensibilización con un alérgeno. Por tanto se estudió, si los anticuerpos anti-IgG1 contra el alérgeno que aumentan con la sensibilización se ven influidos por la administración según la invención de las bacterias. La tabla documenta que los anticuerpos anti-IgG1 dirigidos contra la ovoalbúmina disminuyen en el caso de la aplicación de las bacterias *L. lactis* G121 y *A. lwoffii* F78 en comparación con los ratones no tratados. El aumento de los anticuerpos anti-IgG1 en el caso de la sensibilización por ovoalbúmina reflejan una reacción de los linfocitos T de tipo cooperador 2 ( $T_H2$ ), cuyo aumento puede observarse en alergias. En este caso la tabla 3 muestra que en el caso de la administración de las bacterias se registra una disminución de la concentración de anticuerpo.

Tabla 3

Sensibilización	ninguna	OVA	OVA	OVA
Tratamiento	ninguna	PBS	<i>L. lactis</i> G121	<i>A. lwoffii</i> F78
OVA-IGE [ng/ml]	0	$3,5 \pm 1,5$	$3,9 \pm 0,7$	$4,0 \pm 1,5$
OVA-IgG1 [mg/ml]	0	$3,8 \pm 1,2$	$2,2 \pm 1,2$	$2,5 \pm 1,8$
OVA-IgH2a [ng/ml]	0	$321 \pm 265$	$418 \pm 264$	$245 \pm 278$

### 3.4. Estimulación de CDmo

Se estimularon las CDmo puestas en contacto con las bacterias mediante la adición de las bacterias para sintetizar CD40 y CD86 (datos FACS no mostrados) y concretamente con una estimulación con *A. lwoffii* F78 ya a una concentración de aproximadamente de  $10^2$  a  $10^3$  ufc/ml, en el caso de *L. lactis* G121 a una concentración de aproximadamente  $10^4$  ufc/ml.

Se estudió la expresión de  $TNF\alpha$  e IL-12 tras la estimulación con LPS, *L. lactis* G121 y *A. lwoffii* F78 a nivel de ARNm. Los resultados se muestran en la figura 3A. La expresión aumentada conduce también a un aumento de la liberación de las citocinas mediante las células (figura 3B).

Para someter a prueba la capacidad de las bacterias para modular la polarización de las células  $T_{cooperadoras}$ , se estudió la expresión de ligandos Notch en células dendríticas tras la estimulación con las bacterias. De las células dendríticas se expresan dos grupos por ligandos Notch y su relación es importante para la polarización de las células  $T_{cooperadoras}$ : el grupo delta conduce la polarización de células T en la dirección  $T_H1$ , mientras que el grupo jagged induce las respuestas  $T_H2$ . De la figura 4 debe deducirse que la estimulación de las células con las bacterias tiene como efecto un claro aumento de la expresión de delta-4 con una reducción simultánea de la expresión de jagged.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Bufe <i>et al.</i> , Albrecht	
5	<120> Composición farmacéutica para la protección frente a alergias y enfermedades inflamatorias	
	<130> P13064EPSEQ	
	<140> documento 07004329.4	
	<141> 02/03/2007	
10	<160> 20	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
15	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 1	
	acacatgcaa gtcgag	16
25	<210> 2	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 2	
	ctacttctgg tgcaaca	17
35	<210> 3	
	<211> 16	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 3	
	cctaatacat gcaagt	16
10	<210> 4	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 4	
	gctaccttgt tacgact	17
20	<210> 5	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 5	
30	accggctaac tctgtg	16
	<210> 6	
	<211> 17	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 6	
5	ttcaccgcta cacctgg	17
	<210> 7	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 7	
15	tgcatggaa actggt	16
	<210> 8	
	<211> 17	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 8	
	gtgcatgggt gtcgtca	17
	<210> 9	
	<211> 16	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 9	
	ggaatagcac gagtat	16

	<210> 10	
	<211> 16	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 10	
	tcagttacag gccaga	16
	<210> 11	
	<211> 16	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
20	<400> 11	
	gtcaggcagt ataatc	16
	<210> 12	
25	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 12	
	gggcatatcc tacaac	16
35	<210> 13	
	<211> 17	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 13	
	cctgtagccc atgttgt	17
	<210> 14	
10	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 14	
	ttgaagagga cctggg	16
20	<210> 15	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 15	
	aaaggaagat ggaatt	16
30	<210> 16	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

	<400> 16	
	tgctgctttt gacactg	17
5	<210> 17	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 17	
	ggcctgtttt gtgacca	17
15	<210> 18	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 18	
25	cgacaggtgc agtgt	16
	<210> 19	
	<211> 16	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 19	
	ctggcggctg ggaagg	16



<210> 20

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 20

10 gagggctgca gtcatt

16

## REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para la administración nasal o inhalatoria, que contiene bacterias aisladas que se producen de manera natural, no transgénicas, seleccionadas del grupo que consiste en *Lactococcus* y *Acinetobacter* o fragmentos de éstas o una mezcla de éstas y dado el caso un vehículo farmacéuticamente aceptable para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas o alérgicas, seleccionadas de alergias tipo IV o alergias tipo I dependientes de IgE y enfermedades autoinmunitarias o enfermedades de la piel inflamatorias crónicas.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque se encuentra como aerosol, disolución acuosa, suspensión, liofilizado o polvo.
3. Mezcla de bacterias *Acinetobacter* y *Lactococcus* que se producen de manera natural, no transgénicas, o fragmentos de las mismas como medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas o alérgicas, seleccionadas de alergias tipo IV o alergias tipo I dependientes de IgE y enfermedades autoinmunitarias o enfermedades de la piel inflamatorias crónicas, preferiblemente mediante administración nasal o inhalatoria.
4. Composición según la reivindicación 1 ó 2 o medicamento según la reivindicación 3, que contiene una combinación de *Lactococcus* y *Acinetobacter* en una razón de mezclado de desde 5:95 hasta 95:5.
5. Composición o medicamento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las bacterias se seleccionan de *Lactococcus lactis* y *Acinetobacter lwoffii*.
6. Composición o medicamento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las bacterias se encuentran en estado vivo o muerto.
7. Composición o medicamento según una de las reivindicaciones 1 a 6 para la prevención y/o el tratamiento de alergia al polen, alergias alimentarias, asma, neurodermatitis, dermatitis atópica, eccema por contacto, psoriasis, diabetes tipo 1 ó 2, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedades tiroideas como tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves.
8. Composición o medicamento según una de las reivindicaciones 1 a 7, adecuado para prevenir enfermedades inflamatorias crónicas o alérgicas en lactantes o mujeres embarazadas, que debido a una anamnesis familiar positiva presentan un riesgo claramente más alto de desarrollar una enfermedad de este tipo y/o adecuado para la prevenir o tratar enfermedades inflamatorias crónicas o alérgicas en lactantes o mujeres embarazadas, que presentan las primeras manifestaciones de una enfermedad de este tipo.
9. Composición o medicamento según una de las reivindicaciones 1 a 8, que contiene además al menos una bacteria adicional seleccionada de *Micrococcus spp.*, *Planococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Aerococcus spp.*, *Gemella spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Micromonospora spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Listeria spp.*, *Erysipelothrix spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Clavibacter spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Curtobacterium spp.*, *Microbacterium spp.*, *Aureobacterium spp.*, *Cellulomonas spp.*, *Agromyces spp.*, *Eubacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Xantomonas spp.*, *Frateuria spp.*, *Zoogloea spp.*, *Escherichia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pantoea spp.*, *Erwinia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Actinomyces spp.*, *Streptomyces spp.*, *Nocardia spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Absidia spp.*, *Wallemia spp.*, *Eurotium spp.*, *Acremonium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Cephalosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Trichoderma spp.*, o en combinación con tricotecenos, fumonisinas, gliotoxina, ocratoxinas, patulina, aflatoxinas o fragmentos de los mismos o mezclas de éstos.
10. Procedimiento para la producción de una composición farmacéutica o de un medicamento según una de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas de:
  - a. aislar una bacteria natural, no transgénica, seleccionada del grupo que consiste en *Lactococcus* y *Acinetobacter*
  - b. hacer crecer la bacteria aislada en cultivo
  - c. dado el caso matar y/o liofilizar la bacteria
  - d. dado el caso fragmentar la bacteria
  - e. mezclar la bacteria viva o dado el caso muerta, liofilizada o fragmentada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable se selecciona de agua, alcohol, una solución salina o tampón, una mezcla acuosa alcohólica, polvo farmacéuticamente

aceptable, silicato molido, almidón, celulosa y derivados de celulosa.

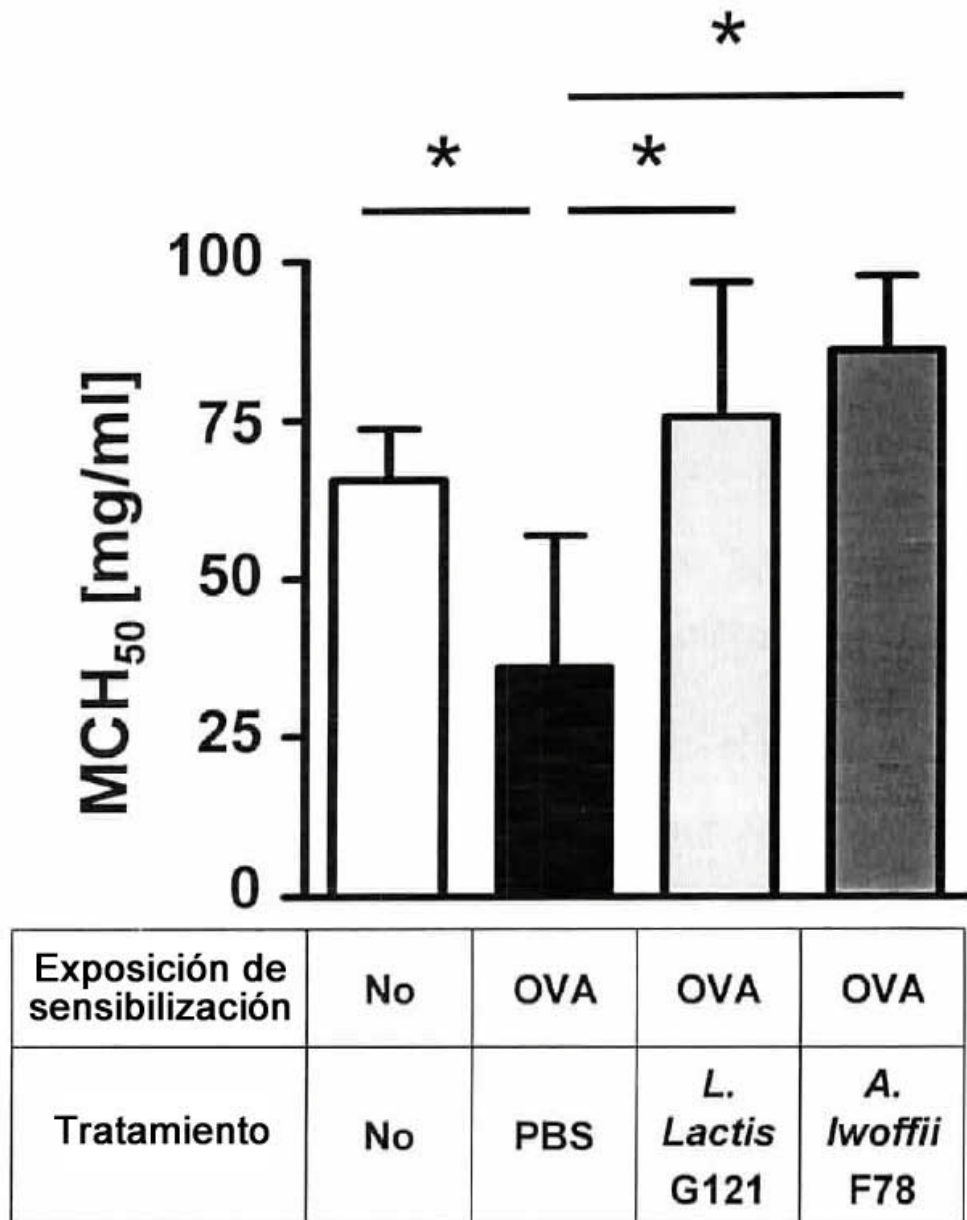


FIG. 1

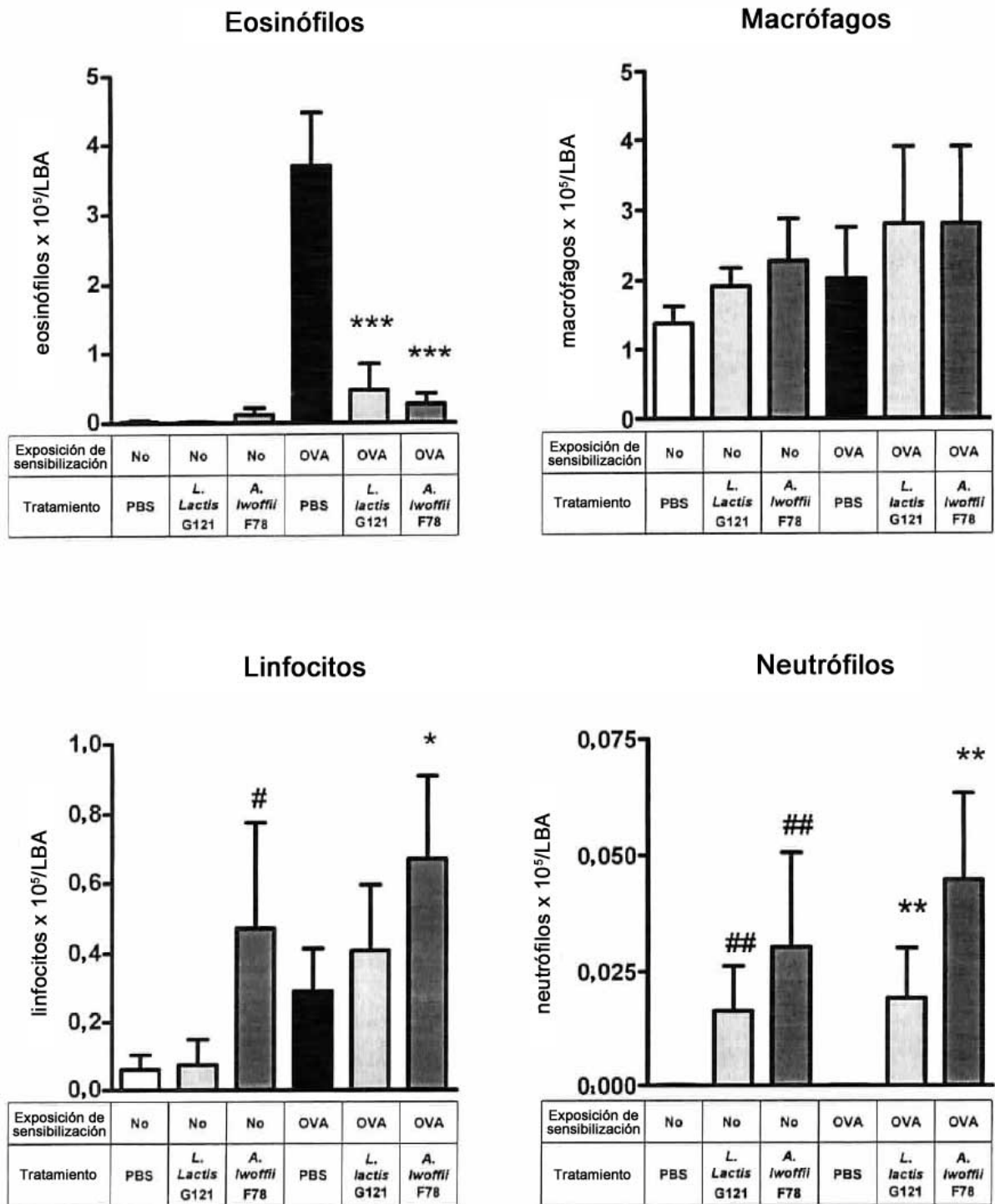


FIG. 2

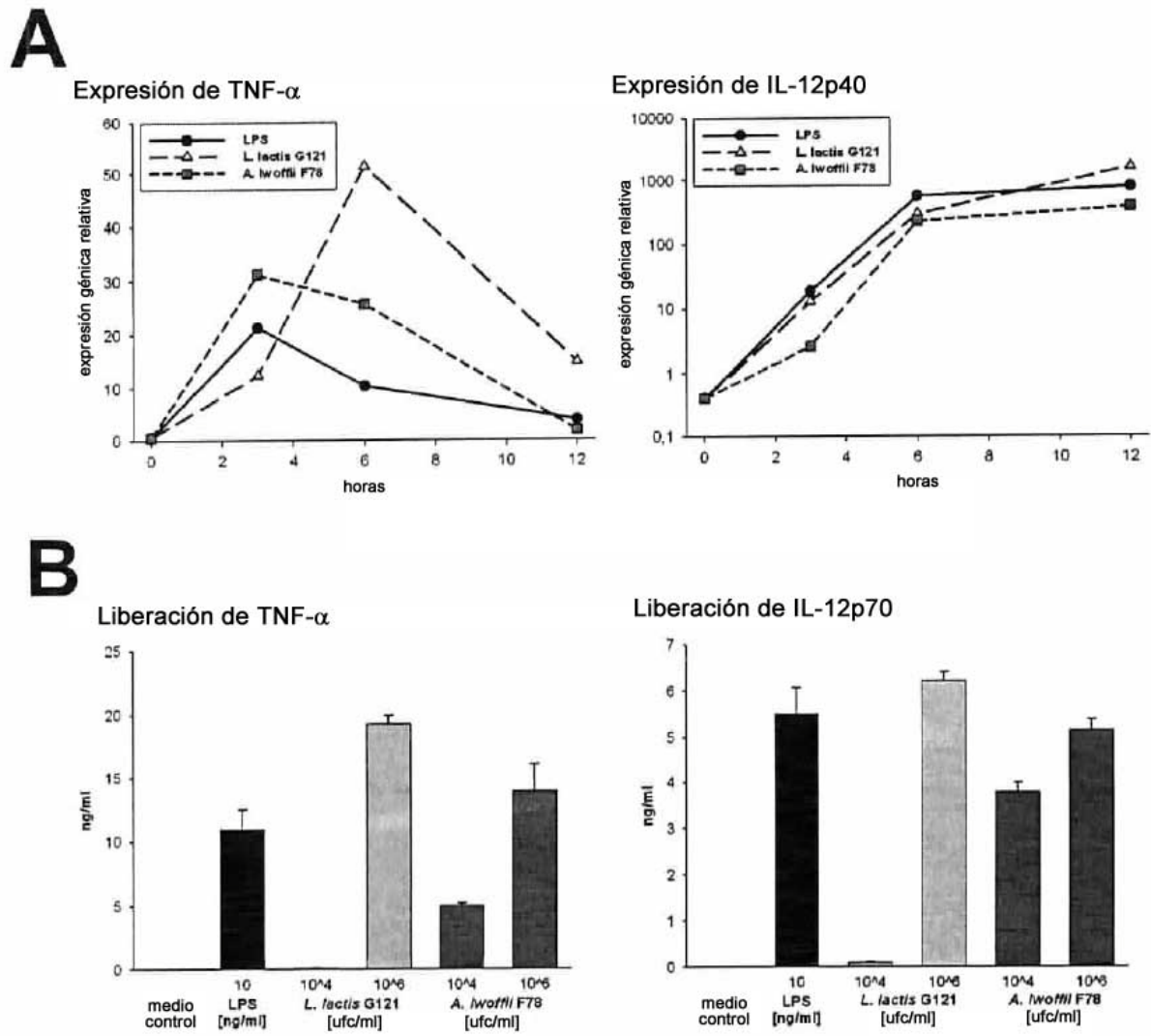
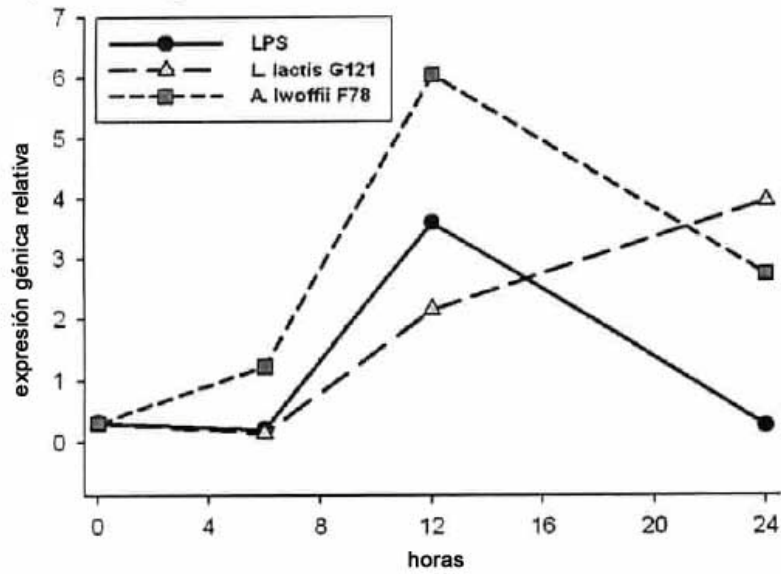
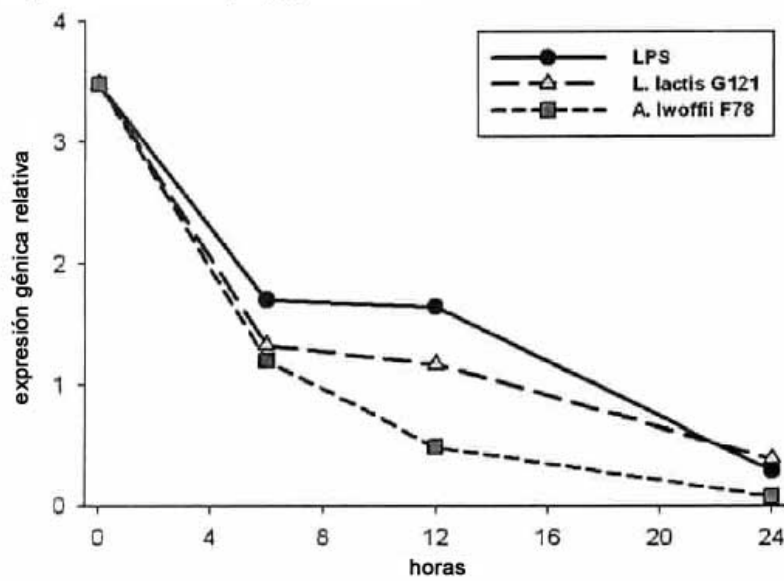


FIG. 3

**Expresión de delta-4****Expresión de jagged-1****FIG. 4**