

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 209**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

A61K 36/35 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009 E 09736935 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2349294**

54 Título: **Composición que comprende una combinación de un extracto de saúco y una cepa de L. paracasei, L. casei, L. bulgaricus o S. thermophilus**

30 Prioridad:

17.10.2008 FR 0857102

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

09.12.2013

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE MÉDICAMENT (50.0%)
45, Place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR y
COMPAGNIE GERVAIS DANONE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MANDEAU, ANNE;
LIBON, CHRISTINE;
ARIES, MARIE-FRANÇOISE;
GROMPONE, GIANFRANCO y
NIBORSKI, VIOLETA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 433 209 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 que comprende una combinación de un extracto de saúco y una cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*.

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende una combinación de un extracto de saúco y al menos una cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*, destinada preferentemente a estimular la inmunidad y/o a promover una respuesta antiinfecciosa y/o antiinflamatoria.

10 El saúco o *Sambucus nigra* L. es un miembro de la familia de *Adoxaceae*.

El género *Sambucus* incluye 25 especies distribuidas por todo el mundo en regiones templadas. El saúco negro, *S. nigra* ssp. *nigra*, crece ampliamente en Europa (Dinamarca, Italia y Austria), en el norte de África y en Asia occidental. El saúco canadiense, *S. nigra* ssp. *canadensis*, procede del noreste de América del Norte, y crece en
15 Oregón, Pensilvania y Kansas, aunque su selección se realice en Canadá.

Los siguientes diversos órganos del saúco: corchos, raíces, tallos, flores, hojas y frutos se usan tradicionalmente en diversos campos que incluyen la medicina, la industria alimentaria y la fabricación de herramientas y juguetes. Las producciones industriales principales actualmente se refieren a la producción de extractos de bayas de saúco dirigida a los mercados nutracéuticos y a la industria colorante.

Algunas publicaciones dan a conocer el efecto del extracto de bayas de saúco sobre la producción de citocinas («The effect of Sambucol, a black elderberry-based, natural product, on the production of animal cytokines: I. Inflammatory cytokines» Eur. Cytokine Netw. 2001 abril-junio; 12(2): 290-296). En particular, ya se ha descrito el efecto de un extracto de bayas de saúco sobre la reducción de los síntomas relacionados con la infección de la gripe debido a los virus de la gripe (A y/o B y/o C), así como su efecto antiviral sobre el virus del herpes simple tipo 1, el virus sincitial respiratorio y el virus paragripal («Randomized Study of the Efficacy and Safety of Oral Elderberry Extract in the treatment of Influenza A and B Virus Infections» The Journal of Int. Med. Res. 2004; 32:132-140).

Muchos estudios científicos han demostrado los efectos ventajosos sobre la salud de ciertos microorganismos contenidos en alimentos fermentados, especialmente productos lácteos. Estos microorganismos se denominan normalmente como “probióticos”. Según la definición actual ampliamente aceptada, los probióticos son: “organismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, tienen un efecto ventajoso sobre la salud del huésped” (véase el informe de la FAO/OMS sobre Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; Córdoba, Argentina; 1-4 de octubre de 2001).

Se ha demostrado en las solicitudes de patente WO96/20607, EP0794707, EP1283714, y FR2912657, que el consumo de productos alimentarios que contienen bacterias probióticas puede dar como resultado efectos deseables sobre la salud, especialmente mediante el balance de la flora intestinal, la mejora de la resistencia a infecciones, y la modulación de la respuesta inmunitaria.

Los microorganismos probióticos usados en la dieta humana son generalmente bacterias de ácido láctico, que pertenecen principalmente a las cepas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y en particular a la especie *Lactobacillus paracasei*.

La solicitud de patente US 2006/0233895 describe una composición que comprende un extracto de saúco que opcionalmente se puede combinar con un probiótico tal como L-casei. Sin embargo, esta composición contiene necesariamente una mezcla de Uncaria Tomentosa, Pau d'Arco, scrutellaria baicalensis y artemisinina. Además, esta composición no está destinada a estimular la inmunidad sino que es para tratar la enfermedad de Lyme provocada por una infección bacteriana, que en consecuencia es muy diferente de infecciones por virus de tipo gripe.

Se ha investigado el efecto *in vitro* de una combinación que comprende un extracto de saúco y al menos una cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus* sobre la producción de mediadores de inmunidad no específicos (citocinas) por células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los resultados de este tipo de modelo *in vitro* están muy correlacionados con los efectos que se pueden obtener *in vivo* (World J. Gastroenterol. 2007; 13(2): 236-243).

El modelo de células PBMC se usa para investigar la capacidad de respuesta de las células del sistema inmunitario humano. Esta respuesta se revela mediante la producción de IL-10, IFN gamma y citocina IL-6.

Con el estrés inflamatorio, se produce IL-10 por los macrófagos para regular la producción de citocinas proinflamatorias tales como TNF-alfa. Promueve una reducción en la presentación de antígenos, reduce la proliferación de linfocitos T, pero en presencia de IL-2, -4 y -7 puede actuar como un factor de diferenciación de linfocitos T citotóxicos. IL-10 mejora la supervivencia de linfocitos B productores de anticuerpos.

El IFN-gamma o IFN tipo II tiene cierta actividad antiviral, e inhibe la proliferación celular. Sin embargo, IFN-gamma es esencialmente inmunomodulador, contrariamente a los IFN tipo I (alfa- y beta-IFN), que tienen principalmente una actividad antiviral. El IFN-gamma activa macrófagos y células NK: por lo tanto influye sobre los mecanismos citotóxicos. Modula la proliferación de linfocitos T y su diferenciación, y se sabe que promueve respuestas inmunitarias de tipo 1 y, por el contrario, inhibe el tipo 2.

La IL-6 es una citocina pleiotrópica que influye sobre las respuestas inmunitarias específicas de antígenos y sobre reacciones inflamatorias. Es uno de los mediadores fisiológicos principales de la reacción de fase aguda. IL-6 es un factor de diferenciación de linfocitos B y un factor de activación para linfocitos T. En presencia de IL-2, IL-6 induce la diferenciación de linfocitos T maduros e inmaduros en linfocitos T citotóxicos. IL-6 e IL-3 actúan sinérgicamente *in vitro* promoviendo la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas multipotentes. La IL-6 es también una tromboopoyetina que induce la maduración de megacariocitos *in vitro* e incrementa los recuentos de plaquetas *in vivo*.

Ambos componentes (extracto de saúco y la cepa *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*) actúan sobre células del sistema inmunitario humano para potenciar respuestas inmunitarias de manera que el cuerpo esté mejor preparado para cualquier agresión infecciosa o cualquier proceso inflamatorio mórbido. Los resultados obtenidos han mostrado que, muy sorprendentemente y de forma inesperada, estos componentes, cuando se encuentran en la misma composición, actúan sinérgicamente sobre respuestas inmunitarias no específicas.

La presente invención se refiere así a una composición que comprende una combinación de un extracto de saúco y al menos una cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*. Preferentemente, dicha composición no contiene Uncaria TomENTOSA y/o Pau d'Arco y/o *Scutellaria baicalensis* y/o artemisinina, en particular tal como se describe en el documento US 2006/0233895. En particular, no contiene una mezcla de Uncaria TomENTOSA, Pau d'Arco, *Scutellaria baicalensis*, y artemisinina.

En una forma de realización específica, la composición según la invención se refiere a una composición que comprende una combinación de un extracto de saúco y al menos una cepa de *L. paracasei*.

En una forma de realización específica, la composición según la invención se puede preparar mediante el procedimiento que comprende las siguientes etapas:

a) preparar una combinación de un extracto de saúco y al menos una cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*;

b) añadir la combinación a la composición según la presente invención.

En este caso, la combinación se prepara así antes de que se añada a la composición. Sin embargo, también es posible preparar una composición según la presente invención añadiendo cada uno de los constituyentes de la combinación separadamente a la composición, es decir, sin preparar la combinación de antemano.

En una forma de realización específica, la composición según la invención se refiere a una composición que comprende una combinación de un extracto de saúco y al menos una cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*.

Preferentemente, la composición según la invención es para administración oral.

Preferentemente, la composición según la presente invención es un alimento, un suplemento alimenticio, un medicamento o un producto OTC (de venta sin receta).

Preferentemente, el extracto de saúco según la presente invención se obtiene de bayas y/o flores de saúco, y preferentemente de bayas de saúco. Ventajosamente, el extracto de saúco según la presente invención es un extracto soluble en agua.

El extracto de saúco usado en el alcance de la presente invención se puede caracterizar por su contenido, por un lado, de antocianos, y, por otro lado, de grandes moléculas tales como proteínas (en particular lectinas).

Preferentemente, el extracto de saúco contiene antocianos, más preferentemente pertenecientes a la familia de pelargonidinas y cianidinas, en una cantidad entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 25%, más preferentemente entre aproximadamente 3% y aproximadamente 25%, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 8% y aproximadamente 16% en peso, basado en el contenido de sólidos del extracto. Preferentemente, el contenido de antociano es igual a aproximadamente 12% en peso, basado en el contenido de sólidos del extracto. Estos contenidos se expresan como cianidin-3-glucósido según el método de HPLC descrito en J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 7846-7856.

Preferentemente, el extracto de saúco contiene proteínas en una cantidad entre 2 y 10% en peso, preferentemente entre 5% y 10% en peso, y más preferentemente entre 5% y 7% en peso, basado en los sólidos (N x 6,25 según el

método de Kjeldahl: Proteínas vegetales, Ed. B. Godon, Collection Sciences et Techniques Agro-alimentaires, Technique et Documentation Lavoisier, París, 1985).

5 Dentro del alcance de la presente invención, el extracto de saúco está comercialmente disponible o se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

10 Se pueden prensar bayas de saúco frescas o congeladas a fin de obtener un zumo tras la filtración. Se puede someter a una etapa de hidrólisis enzimática (pectinasa o una mezcla de pectina metilesterasa y poligalacturonasa) a fin de aclararlo antes de la filtración (Girard B. y Fukumoto L.R. Membrane processing of fruit juices and beverages: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000, 40(2):91-157). Las bayas secas y molidas también se pueden someter a extracción acuosa, seguido de la separación sólido/líquido mediante filtración.

15 Los extractos resultantes se pueden usar como tales, o se pueden concentrar, o se pueden secar en un polvo.

El contenido de antocianos, en esta etapa, está entre 0,5% y 3% en peso basado en el contenido de sólidos del extracto, y es preferentemente igual a aproximadamente 1% (ensayo de HPLC, expresado en cianidin-3-glucósido).

20 El extracto de saúco se puede suplementar en particular con antocianos y/o moléculas de peso molecular elevado (proteínas, polifenoles, polisacáridos).

Para este fin, son posibles varios métodos, y son bien conocidos por los expertos en la materia:

25 - Etapa de ultrafiltración: diafiltración en zumo previamente diluido, seguido de la sobreconcentración sobre una membrana orgánica o inorgánica con un umbral de corte entre 1 y 20 kDa, y preferentemente entre 3 y 10 kDa (Girard B. y Fukumoto L.R. Membrane processing of fruit juices and beverages: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2000, 40(2):91-157).

30 - Pasada sobre una columna de una resina polimérica absorbente de tipo Amberlite XAD.

35 - Extracción hidroalcohólica (una mezcla en cualesquiera proporciones de agua y alcohol de C1 a C4) o disoluciones acuosas de pH ácido (Bronnum-Hansen K. y Flink J.M. Anthocyanin colorants from elderberry (*Sambucus nigra* L.) IV. Further studies on production of liquid extracts, concentrates and freeze dried powders. Int. J. Food Sci Tech 1986, 21(2):605-614; Lee J. y Wrolstad R.E. Extraction of Anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. J. Food Sci. 2004, 69(7):564-573). Esta extracción se puede realizar preferentemente de forma directa sobre las bayas secas y molidas o sobre un puré de bayas frescas.

40 El extracto resultante se puede concentrar térmicamente (a una temperatura no superior a 50°C y a vacío) a fin de incrementar los grados Brix y para estabilizarlo con respecto a contaminaciones microbiológicas. También se puede secar solo o sobre un soporte (por ejemplo maltodextrina, lactosa, etc.).

El zumo suplementado obtenido tiene preferentemente entre 40 y 60° Brix, entre 3 y 25% de antocianos, y entre 5 y 10% de proteínas (método Kjeldahl, N x 6,25) en peso basado en el contenido de sólidos.

45 Preferentemente, la cantidad de sólidos de saúco por dosis unitaria en la composición, según la invención, está entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 1 g. Más preferentemente, la composición contiene entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 500 mg de sólidos de saúco por dosis unitaria, y más preferentemente entre aproximadamente 150 y 300 mg de sólidos de saúco por dosis unitaria, lo más preferible entre 200 mg y 250 mg de sólidos de saúco por dosis unitaria.

50 Dentro del alcance de la presente invención, la expresión "dosis unitaria" se refiere a la cantidad de composición según la invención administrada en una única dosificación. Preferentemente, una dosis unitaria según la presente invención puede corresponder por ejemplo a 100 o 125 ml de yogur, a una cápsula de 1 g, o a un comprimido de 2 g. De este modo, cualquiera que sea el peso de la composición, la cantidad de sólidos de saúco y/o cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus* por dosis unitaria permanece constante. Preferentemente, el régimen de dosificación es de dos dosis unitarias por día.

55 Una cepa de *L. paracasei* muy adecuada dentro del alcance de la presente invención es la cepa de *L. paracasei* depositada el 30 de diciembre de 1994 en la CNCM (en francés Collection Nationale de Cultures of Microorganisms, 28 rue du Docteur Roux, París), con el número de referencia I-1518. Esta cepa, también conocida con el número de referencia DN-114001 o *L. casei* defensis® (nombre comercial), es el objeto de la patente EP 0.794.707. Los efectos de esta cepa potenciando una respuesta inmunitaria sistémica específica para microorganismos patógenos de las vías respiratorias (incluyendo virus de la gripe) se han descrito en la patente EP 1.283.714, y sus efectos potenciando la protección frente a la gripe tras la vacunación se han descrito en la solicitud de patente FR 2.912.657.

La nomenclatura de *Lactobacillus casei* y *paracasei* ha sido hasta ahora el objeto de demandas de modificación, y todavía está actualmente en disputa. La gran mayoría de las cepas citadas como *L. casei* o *L. paracasei* subsp. *paracasei* en la bibliografía son actualmente miembros de la misma especie que se podría denominar *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a fin de satisfacer la actual nomenclatura.

5 Estas cepas bacterianas se pueden usar en combinación con otras bacterias de ácido láctico, o en combinación con fermentos de yogur, es decir, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

10 De este modo, cuando se usa *L. paracasei* en combinación con fermentos de yogur, dicha composición puede comprender además al menos 10^7 y preferentemente entre 5×10^7 y 2×10^8 células de *S. thermophilus* por ml, y al menos 5×10^4 y preferentemente entre 10^5 y 5×10^5 células de *L. bulgaricus* por ml.

15 Una cepa de *L. bulgaricus* muy adecuada dentro del alcance de la presente invención es la cepa de *L. bulgaricus* depositada en la CNCM con el número de referencia I-2787.

Una cepa de *S. thermophilus* muy adecuada dentro del alcance de la presente invención es la cepa de *S. thermophilus* depositada en la CNCM con el número de referencia I-2130.

20 Las bacterias de estas cepas se pueden usar en forma de bacterias completas, vivas o no vivas, y también en forma de lisado bacteriano, o en forma de fracciones bacterianas.

Estas bacterias también se pueden revestir con grasa vegetal, como se describe en la solicitud de patente WO 2005/070221, a fin de mejorar su supervivencia.

25 Preferentemente, la composición contendrá 1×10^7 a 1×10^{11} CFU de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus* por dosis unitaria.

Ventajosamente, la dosis diaria de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus* está entre 10^8 y 10^{10} CFU.

30 Preferentemente, el régimen de dosificación diaria es de dos dosis unitarias por día.

En una realización específica de la invención, la composición contiene, por dosis unitaria,

- 35
- 100 mg a 1 g de sólidos de saúco, preferentemente 150 mg a 500 mg, ventajosamente 150 mg a 300 mg, y más preferentemente 200 mg a 250 mg; y
 - 1×10^7 a 1×10^{11} de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*.

En una realización específica de la invención, la composición contiene, por dosis unitaria,

- 40
- de 3 mg a 200 mg de antocianos de saúco, preferentemente de 10 a 100 mg, y más preferentemente de 20 mg a 50 mg;
 - de 2 mg a 100 mg de proteínas de saúco, preferentemente de 10 mg a 20 mg; y
 - 45 - 1×10^7 a 1×10^{11} de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*.

De este modo, se registra ventajosamente un efecto sinérgico.

50 La combinación de un extracto de saúco y una cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus* según la invención ha mostrado buenas capacidades para inducir/estimular una respuesta inmunitaria no específica, demostrando así su ventaja en los campos alimentario y/o farmacéutico.

55 La composición según la presente invención se puede encontrar preferentemente bajo cualquier forma galénica usada habitualmente en los campos alimentario y/o farmacéutico para la administración oral o sublingual.

60 En el caso de un alimento, este puede ser en particular productos lácteos frescos, productos lácteos fermentados, yogures, leches fermentadas, leches infantiles, polvos, pastillas, zumos vegetales, bebidas, y sus mezclas, seleccionados preferentemente del grupo que consiste en productos lácteos frescos, zumos de frutas y/o de vegetales, o purés de frutas.

65 Ventajosamente, la fruta se selecciona del grupo que consiste en manzana, naranja, bayas rojas, fresa, melocotón, albaricoque, ciruela, frambuesa, mora, grosella roja, limón, uva, plátano, piña, kiwi, pera, cereza, coco, fruta de la pasión, mango, higo, ruibarbo, melón, fruta exótica, lichi, uvas, arándano, o sus mezclas.

Preferentemente, el alimento según la invención es un producto lácteo fresco. Ventajosamente, es un producto

lácteo fermentado. Muy ventajosamente, es un producto lácteo a base de fruta fresco.

Preferentemente con respecto a productos lácteos a base de fruta fresco, el extracto de saúco se añade al producto final por medio de una preparación de fruta. La cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus* se mezcla a su vez en la base láctea como fermento.

Por "producto lácteo fermentado" se debería entender más particularmente un producto lácteo fermentado listo para el consumo humano, esto es, un alimento lácteo fermentado. En la presente solicitud, se proporcionan más particularmente leches fermentadas y yogures. Dichos alimentos lácteos fermentados pueden ser alternativamente "queso blanco" o "*petit-suisse*".

Como se usan en la presente memoria, las expresiones "leches fermentadas" y "yogures" tienen sus significados habituales en el campo de la industria láctea, es decir, productos destinados al consumo humano, y que resultan de la fermentación láctica acidificante de un sustrato lácteo. Estos productos pueden contener ingredientes secundarios tales como fruta, plantas, azúcar, etc. Por ejemplo, refiérase a la Orden Francesa nº 88-1203 de 30 de diciembre de 1988 que se refiere a leches fermentadas y yogur, publicada en el Journal Officiel de la République Française el 31 de diciembre de 1988. También hágase referencia al "Codex Alimentarius" (preparado por la Commission of the Codex Alimentarius con los auspicios de la FAO y de la OMS, y publicado por la Information Division de la FAO, disponible en línea en <http://www.codexalimentarius.net>; véase más particularmente el Volumen 12 del Codex Alimentarius "Codex Standards for milk and dairy products", y el estándar "CODEX STAN A -1 1(a)-1975").

En la presente solicitud, la expresión "leche fermentada" se usa así solamente para designar un producto lácteo preparado con un sustrato lácteo que se ha sometido a un proceso al menos equivalente a la pasteurización, sembrado con microorganismos que pertenecen a la especie característica de cada producto. Una "leche fermentada" no se ha sometido a ningún proceso que elimine un elemento constituyente del sustrato lácteo empleado, y en particular no se ha sometido a un consumo del coágulo. La coagulación de "leches fermentadas" no se debe obtener por medios distintos de aquellos que resultan de la actividad de los microorganismos usados. En la práctica, la expresión "leche fermentada" se usa así generalmente para designar leches fermentadas distintas de yogures, y se puede denominar, según el país, como "Kefir", "Kumiss", "Lassi", "Dahi", "Leben", "Filmjölk", "Villi", "Acidophilus milk", por ejemplo.

En cuanto al término "yogur", se usa para designar leche fermentada obtenida tradicional y consistentemente mediante el desarrollo de bacterias de ácido láctico termófilas específicas para dichas *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que deberían mantenerse vivas en el producto acabado, en una cantidad de al menos 10 millones de bacterias por gramo, basado en la parte de leche. En algunos países, las normativas autorizan la adición de otras bacterias de ácido láctico en la producción de yogur, y en particular el uso adicional de cepas de *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus acidophilus*. Estas cepas lácticas adicionales se dirigen a conferir al producto acabado diversas propiedades, tales como la propiedad de promover el equilibrio de la flora intestinal, o controlar el sistema inmunitario.

La cantidad de ácido láctico libre contenido en el sustrato lácteo fermentado no debe de ser menor que 0,6 g por 100 g cuando se venda al consumidor, y el contenido de materia proteica proporcionado por la parte de leche no debería ser menor que el de la leche normal.

El término "queso blanco" o "*petit-suisse*" se usa en la presente solicitud para designar exclusivamente un queso no curado, no salado, que se ha fermentado con bacterias de ácido láctico solamente (ninguna otra fermentación distinta de la fermentación con ácido láctico). El contenido de sólidos en el queso blanco se puede reducir hasta 15 g o 10 g por 100 g de queso blanco, según si el contenido de grasa es 25% mayor que 20 g, o como máximo igual a 20 g, por 100 g de queso blanco, cuando está completamente seco. El contenido de sólidos de un queso blanco está entre 13 y 20%. En cuanto al contenido de sólidos de una *petit-suisse*, no es menor que 23 g por 100 g de *petit-suisse*. Generalmente está entre 25 y 30%. El queso blanco y el *petit-suisse* se denominan generalmente de forma habitual como "requesón", usado tradicionalmente en el campo técnico de la presente invención.

Preferentemente, el producto lácteo fresco se selecciona de yogures que incluyen yogures batidos, yogures bebibles, requesón y leches fermentadas.

Dentro del significado de la presente invención, "suplemento alimenticio" se refiere a un producto alimentario destinado a complementar una dieta normal y que es una fuente concentrada de nutrientes u otras sustancias que tienen un efecto dietético o fisiológico, solo o en combinación.

Preferentemente, el suplemento alimenticio puede comprender vitaminas y/o minerales y/u oligoelementos.

Estas vitaminas incluyen en particular las vitaminas A, E, C, y las vitaminas del grupo B, en particular vitamina B6. Ventajosamente, estas son vitaminas C, E y B6.

La vitamina A (retinol o carotenoides), vitamina E y vitamina C son las 3 vitaminas antioxidantes principales. De

hecho, estas vitaminas antioxidantes tienen la capacidad para controlar la producción de radicales libres que resultan del metabolismo del oxígeno, cuya sobreproducción es responsable de un gran número de afecciones, especialmente cardiovasculares, inmunitarias, cáncer, envejecimiento acelerado de la piel, enfermedades neurodegenerativas, etc.

5 En particular, la vitamina C es un agente antioxidante bien conocido, que es soluble en agua. Los seres humanos se basan en fuentes externas de vitamina C para satisfacer sus necesidades de vitamina C. De este modo, el ácido ascórbico, ascorbato de sodio, o una mezcla de los mismos, son una fuente de vitamina C.

10 La vitamina E es también un agente antioxidante bien conocido. La vitamina E puede funcionar sinérgicamente con la vitamina C a fin de proteger la función celular vital frente a agentes oxidantes normales. El acetato de alfa-tocoferilo, el acetato de trimetil-tocoferilo y/o el succinato de vitamina E son fuentes de vitamina E.

15 Las vitaminas B forman un grupo de vitaminas hidrosolubles que incluyen vitamina B1 o tiamina, vitamina B2 o riboflavina, vitamina B3 (PP) o nicotinamida, vitamina B5 o ácido pantoténico, vitamina B6 o piridoxina, vitamina B8 (H) o biotina, vitamina B9 o ácido fólico, vitamina B12 o cianocobalamina.

Preferentemente, los minerales se seleccionan de hierro, cinc, selenio, cromo, cobre, y sus mezclas.

20 El cinc tiene una acción antioxidante como cofactor para aquellas enzimas que están implicadas directamente en la defensa frente a agentes oxidantes. El óxido de cinc, el gluconato de cinc, el citrato de cinc, el acetato de cinc, el cloruro de cinc, el lactato de cinc o el sulfato de cinc se pueden usar solos o como una mezcla en las composiciones según la presente invención. Se prefiere el gluconato de cinc.

25 El selenio también tiene una acción antioxidante como cofactor (tal como glutatona peroxidasa) para aquellas enzimas que están implicadas directamente en la defensa frente a agentes oxidantes.

30 En el caso de un suplemento alimenticio o un medicamento, se pueden prever las siguientes formas galénicas: comprimidos tragables, comprimidos masticables, comprimidos efervescentes, cápsulas, pastillas, píldoras, polvos, gránulos, disoluciones o suspensiones orales, y formas de dosificación sublinguales y bucales. Las formas galénicas preferidas son comprimidos o cápsulas.

35 Cuando se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, el principio activo principal se puede mezclar con un vehículo farmacéutico tal como gelatina, almidón, lactosa, estearato de magnesio, talco, goma arábiga, o similar. Los comprimidos se pueden revestir con sacarosa u otros materiales adecuados, o se pueden procesar para que tengan una acción sostenida o retrasada y para liberar de forma continua una cantidad predeterminada de principio activo.

40 Una preparación en cápsulas se prepara mezclando el principio activo con un diluyente e introduciendo la mezcla resultante en cápsulas blandas o duras.

Una preparación en forma de jarabe o elixir puede contener el principio activo junto con un edulcorante, un antiséptico, así como un agente saborizante y un colorante adecuado.

45 Los polvos o gránulos dispersables en agua pueden contener el principio activo como una mezcla con agentes dispersantes o agentes humectantes, o agentes de suspensión, así como correctores del sabor o edulcorantes.

50 Otro objeto de la presente invención es una composición según la presente invención para uso como un medicamento.

Otro objeto de la presente invención es una composición según la presente invención para estimular la inmunidad y/o potenciar las defensas inmunitarias, y/o promover una respuesta antiinfecciosa y/o antiinflamatoria.

55 Otro objeto de la presente invención es una composición para su utilización en el tratamiento y/o prevención de infecciones respiratorias y/o intestinales.

60 Otro objeto de la presente invención es una composición para su utilización en el tratamiento y/o prevención de síntomas provocados en particular por una infección por virus del herpes simple tipo 1, virus sincitial respiratorio, y virus de la gripe (A y/o B y/o C) y paragripal, preferentemente los síntomas de afecciones de la gripe, especialmente causados por el virus de la gripe (A y/o B y/o C).

65 La composición según la invención es particularmente adecuada para el tratamiento y/o prevención de síntomas de afecciones de la gripe provocados por una infección por virus de la gripe (*Orthomyxovirus*, *Influenzae* A, B o C). Estos síntomas incluyen resfriados, rinitis, tos, inflamaciones de la membrana de la mucosa nasal (rinorrea, obstrucción nasal, estornudos), dolor de garganta (diversas manifestaciones: hormigueos, dificultades para tragar), fiebre, cefalea, mialgia, fatiga.

Estos “problemas del invierno” están asociados con el debilitamiento de nuestras defensas inmunitarias.

5 Otro objeto de la presente invención es la utilización de la composición para preparar un alimento, un suplemento alimenticio o un medicamento.

Otro objeto de la presente invención es la utilización de la composición para preparar un medicamento destinado al tratamiento y/o prevención de infecciones respiratorias y/o intestinales.

10 Otro objeto de la presente invención es la utilización de la composición para preparar un medicamento destinado al tratamiento y/o prevención de síntomas de una infección por el virus del herpes simple de tipo 1, el virus sincitial respiratorio y el virus de la gripe (A y/o B y/o C) y paragripal, preferentemente síntomas de afecciones de la gripe, provocados especialmente por el virus de la gripe (A y/o B y/o C).

15 Otro objeto de la presente invención es la utilización de la composición para preparar un medicamento para uso para estimular la inmunidad y/o promover una respuesta antiinfecciosa y/o antiinflamatoria.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para potenciar las defensas inmunitarias, que comprende la administración oral de una composición basada en una combinación de un extracto de saúco y al menos una cepa de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus*.

20 La descripción se refiere a las figuras adjuntas, en las que:

25 La figura 1 muestra la producción de IL-10 inducida por un extracto de saúco solo o en combinación con una relación *L. paracasei*:PBMC de 4,5:1.

Leyenda de la figura 1

•	Extracto de saúco
○	(saúco + <i>L. paracasei</i> CNCM I-1518) teórico
◆	(saúco + <i>L. paracasei</i> CNCM I-1518) experimental

30 La figura 2 muestra la producción de IFN-gamma inducida por *L. paracasei* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml.

Leyenda de la figura 2

•	<i>L. paracasei</i> CNCM I-1518
○	(<i>L. paracasei</i> CNCM I-1518 + saúco) teórico
◆	(<i>L. paracasei</i> CNCM I-1518 + saúco) experimental

35 La figura 3 muestra la producción de IL-6 inducida por *L. paracasei* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml.

Leyenda de la figura 3

•	<i>L. paracasei</i> CNCM I-1518
○	(<i>L. paracasei</i> CNCM I-1518 + saúco) teórico
◆	(<i>L. paracasei</i> CNCM I-1518 + saúco) experimental

40 La figura 4 muestra la producción de IL-6 inducida por una cepa de *L. casei* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml.

45 Leyenda de la figura 4

•	<i>L. casei</i>
○	(<i>L. casei</i> + saúco) teórico
◆	(<i>L. casei</i> + saúco) experimental

50 La figura 5 muestra la producción de IL-6 inducida por *L. bulgaricus* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml.

Leyenda de la figura 5

•	<i>L. bulgaricus</i> CNCM I-2787
○	(<i>L. bulgaricus</i> CNCM I-2787 + saúco) teórico
◆	(<i>L. bulgaricus</i> CNCM I-2787 + saúco) experimental

5 La figura 6 muestra la producción de IL-6 inducida por *S. thermophilus* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml.

Leyenda de la figura 6

•	<i>S. thermophilus</i> CNCM I-2130
○	(<i>S. thermophilus</i> CNCM I-2130 + saúco) teórico
◆	(<i>S. thermophilus</i> CNCM I-2130 + saúco) experimental

10 La figura 7 muestra la producción de IL-6 inducida por una cepa de *L. brevis* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml.

Leyenda de la figura 7

•	<i>L. brevis</i>
○	(<i>L. brevis</i> + saúco) teórico
◆	(<i>L. brevis</i> + saúco) experimental

15 La figura 8 representa la actividad citotóxica de células NK de ratones que recibieron el vehículo (verde), la formulación completa (1500 mg/kg; rojo), *L. paracasei* DN-114 001 + mezcla láctea (393 mg/kg; azul), el extracto de bayas de saúco (296 mg/kg; violeta) o vitaminas + minerales (282 mg/kg; gris). Valores p: formulación completa comparada con el vehículo.

20

Leyenda de la figura 8

■	formulación completa
▲	vitaminas + minerales
◆	extracto de bayas de saúco
-	vehículo
•	<i>L. paracasei</i> + mezcla láctea

25 La invención se pondrá más claramente de manifiesto haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que son formas de realización específicas de las composiciones según la invención.

EJEMPLO 1: Preparación de un extracto de saúco usada dentro del alcance de la presente invención

30 El extracto de saúco se obtiene de zumo de bayas de saúco enriquecido con antocianos y secado sobre maltodextrina. El enriquecimiento se llevó a cabo usando un proceso de filtración de membrana según el método a continuación:

35 Se diluyeron con 284 litros de agua (11 volúmenes de agua por 1 volumen de zumo) 26 litros de zumo de saúco aclarado. Los 310 litros resultantes se agitaron y se calentaron hasta 45°C, y después se diafiltraron en una primera membrana de 5 kDa con adición de 7 volúmenes de agua por volumen de zumo (es decir, 181 l). El permeado de la diálisis se concentró entonces mediante ultrafiltración en una membrana de 5 kDa (membrana piloto de 5/10 kDa que tiene un área superficial unitaria de 5,8 m²). El retenido de la ultrafiltración se concentró térmicamente a vacío a una temperatura no superior a 50°C, y después se atomizó sobre un soporte de maltodextrina de manera que la cantidad de maltodextrina es menor o igual a 30% (p/p). Las características del extracto resultante son:

- 40
- Contenido de antociano: 10-14% en peso basado en el contenido de sólidos del extracto (expresado como cianidin-3-glucósido según el método de HPLC descrito en J Agric Food Chem 2004, 52, 7846-7856)
 - 45 - Contenido proteico: 5-7% en peso basado en el contenido de sólidos del extracto (N x 6,25 según el método de Kjeldahl)

EJEMPLO 2: Estudio *in vitro* de efectos inmunomoduladores combinados de la cepa *L. paracasei* CNCM I-1518 con un extracto de saúco en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Material y método

5 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sujetos sanos, se resuspendieron y se distribuyeron en placas de 24 pocillos a $0,5 \times 10^6$ células/pocillo. Estas PBMC se incubaron toda la noche a 37°C con diversas concentraciones de extracto de saúco (3 - 10 - 30 - 100 mg/ml de sobrenadante de cultivo de células PBMC) en presencia o en ausencia de una cantidad de *L. paracasei* (4,5 *L. paracasei* por 1 PBMC), o
10 alternativamente con diferentes relaciones *L. paracasei*:PBMC (0,5:1 - 1:1 - 2:1 - 4,5:1) en presencia o en ausencia de extracto de saúco a 10 µg/ml de sobrenadante de cultivo de células PBMC.

El extracto de saúco usado se preparó según el Ejemplo 1.

15 Los sobrenadantes de cultivo se recuperaron para determinar las citocinas (IL-10 e IFN-gamma) mediante citometría de flujo.

Dentro del alcance de la presente combinación, el saúco y *L. paracasei* combinados no tienen la misma unidad de medida, es decir, una concentración en µg/ml y una relación de número de bacterias:PBMC, respectivamente.

20 A fin de determinar si la combinación de extracto de saúco + *L. paracasei* produce un efecto sinérgico, se usó el método descrito en la publicación de Etievant C, Kruczynski A, Barret JM y al. «F 11782, a dual inhibitor of topoisomerases I and II with an original mechanism of action *in vitro*, and markedly superior *in vivo* antitumour activity, relative to three other dual topoisomerase inhibitors, intoplicin, aclarubicin and TAS-103» Cancer Chemother. Pharmacol. 2000; 46: 101-113.
25

Esta publicación enseña la comparación e interpretación de los resultados experimentales, en comparación con la gráfica de una curva teórica.

30 Esta última se basa en datos experimentales variables para un compuesto (por ejemplo una concentración creciente de extracto de saúco) y en un dato experimental fijo para el segundo compuesto (por ejemplo una relación fija de número de bacterias: PBMC).

35 La curva teórica en la figura 1, que muestra la producción de IL-10 inducida por un intervalo de dosis de extracto de saúco en combinación con una relación fija de *L. paracasei*:PBMC de 4,5:1, se representó gráficamente añadiendo a cada punto experimental de la curva para el saúco solo (●) la contribución de la relación de *L. paracasei*:PBMC de 4,5:1. Esta contribución, según se determina experimentalmente, es 2,4 pg/ml de IL-10.

Tabla de los datos en la figura 1

40

		Concentración de saúco (µg/ml)			
		3	10	30	100
IL 10 (pg/ml)	Extracto de saúco (●)	1,5	7,8	15,4	18
	(saúco + <i>L. paracasei</i>) teórico (O)	3,9 (1,5 + 2,4)	10,2 (7,8 + 2,4)	17,8 (15,4 + 2,4)	20,4 (18 + 2,4)
	(saúco + <i>L. paracasei</i>) experimental (◆)	6,6	19,7	36	32,5

45 La curva teórica en la figura 2, que muestra la producción de IFN-gamma inducida por un intervalo de dosis de *L. paracasei* en combinación con un extracto de saúco a la concentración fija de 10 µg/ml, se representó gráficamente añadiendo a cada punto experimental de la curva para *L. paracasei* sola (●) la contribución del extracto de saúco a 10 µg/ml. Esta contribución, determinada experimentalmente, es 5 pg/ml de IFN-gamma.

Tabla de los datos para la figura 2

		relación de <i>L. paracasei</i> :PBMC			
		0,5:1	1:1	2:1	4,5:1
IFN-γ (pg/ml)	<i>L. paracasei</i> (●)	3	1,5	7,1	14,2
	(<i>L. paracasei</i> + saúco) teórico (O)	8 (3 + 5)	6,5 (1,5 + 5)	12,1 (7,1 + 5)	19,2 (14,2 + 5)
	(<i>L. paracasei</i> + saúco) experimental (◆)	8,7	18,5	20,9	31,9

Resultados

Las figuras 1 y 2 proporcionan los resultados obtenidos:

- 5 - La figura 1 muestra la producción de IL-10 inducida por un extracto de saúco solo o en combinación con una relación de *L. paracasei*:PBMC de 4,5:1
- La figura 2 representa la producción de IFN-gamma inducida por *L. paracasei* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml.

10 Se estudió el efecto sobre la respuesta inmunitaria no específica inducida por el extracto de saúco solo o en combinación con una relación particular de *L. paracasei*:PBMC (4,5:1).

15 La concentración de citocina obtenida con una relación de *L. paracasei*:PBMC de 4,5:1 es 2,4 pg/ml.

Una comparación de los resultados obtenidos experimentalmente con los valores de la curva teórica muestra que *L. paracasei* potencia el efecto del extracto de saúco solo: la combinación proporciona una producción de IL-10 que es mucho mayor que la suma de los 2 efectos (extracto de saúco por un lado y *L. paracasei* por otro lado).

20 Se ha examinado también el efecto de las diversas relaciones de *L. paracasei*:PBMC, solas o en combinación con una concentración fija de extracto de saúco (10 µg/ml), sobre la producción de interferón gamma.

La concentración de citocina obtenida con el extracto de saúco a la concentración de 10 µg/ml es 5 pg/ml.

25 Una comparación de las diversas curvas obtenidas muestra que el extracto de saúco potencia el efecto de *L. paracasei*: la combinación proporciona una producción de IFN-gamma que es mayor que la suma de los 2 efectos (*L. paracasei* por un lado y extracto de saúco por otro lado).

Conclusiones:

30 El extracto de saúco y CNCM I-1518 (DN-114 001) de *L. paracasei* actúan sinérgicamente sobre las respuestas inmunitarias no específicas, haciendo así a las células del sistema inmunitario humano más reactivas frente a agresiones infecciosas o procesos inflamatorios mórbidos.

EJEMPLO 3: Estudio *in vitro* de la especificidad de la cepa

Material y método

40 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sujetos sanos, se resuspendieron y se distribuyeron en placas de 24 pocillos a $0,5 \times 10^6$ células/pocillo. Estas PBMC se incubaron toda la noche a 37°C con diferentes concentraciones de cepa:PBMC (0,5:1 - 1:1 - 2:1 - 4,5:1) en presencia o en ausencia de extracto de saúco a 10 µg/ml de sobrenadante de cultivo de células PBMC.

45 El extracto de saúco usado se preparó según el Ejemplo 1.

Para este estudio *in vitro*, se han ensayado cinco cepas: una cepa de *Lactobacillus paracasei* (CNCM I-1518), una cepa de *Lactobacillus casei*, una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* (CNCM I-2787), una cepa de *Streptococcus thermophilus* (CNCM I-2130) y una cepa de *Lactobacillus Brevis*.

50 Los sobrenadantes de cultivo se recuperaron para determinar la citocina IL-6 mediante ELISA.

A fin de determinar si las combinaciones de extracto de saúco/cepa producen un efecto sinérgico, se usó el método descrito en la publicación de Etievant C. et al (véase anteriormente). Esta publicación enseña la comparación e interpretación de los resultados experimentales, comparados con la gráfica de una curva teórica.

55 Esta última se basa en datos experimentales variables para la relación creciente de número de bacterias:PBMC y en datos experimentales fijos para la concentración de extracto de saúco.

60 Las curvas teóricas en la figura 3-7, que muestran la producción de IL-6 inducida por un intervalo de dosis de cepas en combinación con un extracto de saúco a una concentración fija de 10 µg/ml, se representaron gráficamente añadiendo a cada punto experimental de la curva para la cepa sola (●) la contribución del extracto de saúco a 10 µg/ml. Esta contribución se determinó experimentalmente para cada experimento.

Resultados

Las figuras 3 a 7 dan los resultados obtenidos:

- 5 - La figura 3 representa la producción de IL-6 inducida por *L. paracasei* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml (la concentración de citocina obtenida con el extracto de saúco a la concentración de 10 µg/ml es 7,7 ng/ml);
- 10 - La figura 4 representa la producción de IL-6 inducida por *L. casei* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml (la concentración de citocina obtenida con el extracto de saúco a la concentración de 10 µg/ml es 2,2 ng/ml);
- 15 - La figura 5 representa la producción de IL-6 inducida por *L. bulgaricus* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml (la concentración de citocina obtenida con el extracto de saúco a la concentración de 10 µg/ml es 2,0 ng/ml);
- 20 - La figura 6 representa la producción de IL-6 inducida por *S. thermophilus* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml (la concentración de citocina obtenida con el extracto de saúco a la concentración de 10 µg/ml es 2,4 ng/ml);
- 25 - La figura 7 representa la producción de IL-6 inducida por *L. brevis* sola o en combinación con un extracto de saúco a 10 µg/ml (la concentración de citocina obtenida con el extracto de saúco a la concentración de 10 µg/ml es 6,0 ng/ml).

Se estudió para 5 cepas diferentes el efecto de diversas relaciones de cepa:PBMC, solas o en combinación con una concentración fija de extracto de saúco (10 µg/ml), sobre la producción de IL-6.

El experimento llevado a cabo con *L. paracasei* (figura 3) confirma que el extracto de saúco potencia el efecto de *L. paracasei*: la combinación proporciona una producción de IL-6 que es mayor que la suma de los 2 efectos (*L. paracasei* por un lado y extracto de saúco por otro lado).

Este tipo de sinergia también se ha observado con *L. casei*, *L. bulgaricus*, o *S. thermophilus* pero no con *L. brevis*, mostrando que el efecto sinérgico es específico de la cepa.

Conclusión:

Se ha confirmado que el extracto de saúco y *L. paracasei* actúan sinérgicamente sobre respuestas inmunitarias no específicas, haciendo así a las células del sistema inmunitario humano más reactivas frente a agresiones infecciosas o procesos inflamatorios mórbidos.

Además, se ha observado que el efecto sinérgico es específico de la cepa. El extracto de saúco y *L. casei*, *L. bulgaricus*, o *S. thermophilus* actúan sinérgicamente sobre respuestas inmunitarias no específicas.

Por el contrario, no se observó sinergia para la asociación de extracto de saúco y *L. brevis*. De este modo, esta cepa pudo servir como control negativo para otras investigaciones.

EJEMPLO 4: Estudio *in vivo* de la actividad citotóxica de esplenocitos de ratones que reciben una formulación completa

Introducción

Como se demuestra en los ejemplos 2 y 3, el extracto de bayas de saúco y probióticos tales como *L. paracasei* DN-114 001 *in vitro* actúan sinérgicamente a fin de producir una mayor producción de citocinas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la formulación completa *in vivo* sobre una función inmunitaria y comparar su actividad con cada grupo de ingredientes:

- *L. paracasei* + mezcla láctea
- extracto de bayas de saúco
- mezcla de vitaminas y sales minerales = vitaminas + minerales

El extracto de saúco usado se preparó según el Ejemplo 1.

La formulación completa es una combinación de los siguientes ingredientes: *L. paracasei* + mezcla láctea, el extracto

de bayas de saúco, la mezcla de vitaminas y sales minerales, y los excipientes. La cantidad administrada para cada ingrediente de los 3 grupos de ingredientes es igual a la cantidad correspondiente del ingrediente presente en la formulación completa.

- 5 Para este fin, se escogió monitorizar la función de las células asesinas naturales (NK). De hecho, las respuestas inmunitarias innatas, incluyendo células NK, son críticas para la defensa del huésped frente a los virus respiratorios. Las células NK representan una subpoblación linfocítica diferente que desempeña un papel importante en la fase temprana de respuestas inmunitarias frente a ciertos virus, parásitos, y patógenos microbianos (3) mostrando funciones citotóxicas. Además, existe cada vez mayor evidencia de que las células NK tienen funciones importantes a la hora de influir sobre la naturaleza de la respuesta inmunitaria adaptativa (1; 2).

Materiales y métodos

Animales y tratamientos

- 15 Se asignaron al azar ratones hembra BALB/c, de 7 semanas, a uno de cinco grupos:

Grupo 1 → Vehículo (agua estéril)

- 20 Grupo 2 → Formulación completa (1500 mg/kg)

Grupo 3 → *L. paracasei* DN-114 001 + mezcla láctea (393 mg/kg)

- 25 Grupo 4 → Extracto de bayas de saúco (296 mg/kg)

Grupo 5 → Vitaminas + minerales (282 mg/kg)

- 30 Se trataron oralmente en los días D0, D1 y D2, con 10 ml/kg de producto de ensayo. En el día D9, los animales se sacrificaron y se retiraron los bazo.

Ensayo de citotoxicidad

- 35 La actividad citolítica frente a dianas se determinó usando el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96. Se recogieron esplenocitos de ratones y se cocultivaron con células YAC-1 (estirpe celular de linfoma T de ratón) como células diana a relaciones apropiadas de recuento de células efectoras a células diana, en placas de 96 pocillos con fondo en V. Después de 4 horas de incubación a 37°C, se midió la cantidad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en sobrenadantes. La cantidad de LDH liberada se midió usando sustrato LDH, y se evaluó a 490 nm. Para cada ratón, se determinó el porcentaje medio de citotoxicidad de NK (%) a tres relaciones de efectoras/diana (100:1 - 50:1 - y 25:1) usando la siguiente fórmula:

- 40
$$\frac{[A_{490} \text{ liberación experimental} - (A_{490} \text{ liberación espontánea de células efectoras} + A_{490} \text{ liberación espontánea de células diana}) \times 100]}{A_{490} \text{ liberación máxima de células diana} - A_{490} \text{ liberación espontánea de células diana}}$$

Análisis estadístico

- 45 Se llevó a cabo un análisis estadístico usando el paquete SigmaStat 3.5 para Windows. Los resultados se evaluaron con el Análisis de Varianza de una Vía, seguido de un grupo de comparación múltiple usando el método de Holm-Sidak. En todos los casos, $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

- 50 Se investigó la actividad citotóxica de esplenocitos de ratones que reciben la formulación completa o cada ingrediente. Los esplenocitos de ratones inmunizados con la formulación completa ejercieron actividades citotóxicas significativamente mayores frente a células diana YAC-1 en comparación con los de ratones que recibieron el vehículo (agua) (figura 8). Por el contrario, los ratones inmunizados con ingredientes individuales no aumentaron las actividades citotóxicas frente a células diana YAC-1.

Conclusión

- 60 Estos datos muestran claramente que la combinación de ingredientes, individualmente ineficaces sobre la activación de células NK, resultan completamente activos cuando se combinan en cantidades apropiadas.

Referencias

- 65 1. Di Santo, J.P. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 257-

286 (2006)

2. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. y Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503-510 (2008)

3. Lodoen, M.B. y Lanier, L.L. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 391-398 (2006).

EJEMPLO 5: Suplemento alimenticio

Se podría considerar cualquier tipo de suplemento alimenticio. Como ejemplo, la dosis unitaria podría ser una cápsula de 1 g o un comprimido de 2 g.

La composición general es como sigue:

Sólidos de saúco (según el Ejemplo 1)	30%
Polvo de leche fermentada que contiene <i>L. paracasei</i> DN-114 001	40%
Mezcla de vitaminas (vitaminas C, E y B6)	24 – 27%
Gluconato de cinc (cinc)	2 – 5%
Seleniato de sodio (selenio)	0,1 – 0,5%

Por lo tanto, la población de *L. paracasei* DN-114 001 del comprimido o cápsula es 2×10^{10} CFU al final del procedimiento de preparación.

Este suplemento alimenticio se obtiene mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia. En particular, la cepa de *L. paracasei* y el extracto de saúco se añaden independientemente entre sí a la composición para obtener como ejemplos el comprimido o cápsula.

EJEMPLO 6: Producto lácteo fermentado

La dosis unitaria corresponde a 100 ml de producto lácteo fermentado. Sin embargo, se debería observar que, por ejemplo, 100 g de Actimel® corresponde a 94-97 ml de producto, dependiendo de la receta ligera o estándar considerada.

El producto lácteo fermentado contiene (en % en peso):

- 95% de producto lácteo fermentado mediante una cepa de *L. paracasei* DN-114 001 (CNCM I-1518) (producto tipo Actimel®) y mediante cepas comerciales de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.
- 5% de una preparación de frutas rojas tradicional que contiene 5% de zumo de extracto de saúco concentrado como se describe en el Ejemplo 1.

El contenido de sólidos del producto lácteo fermentado es de aproximadamente 17% antes de secar.

Composición del producto lácteo fermentado (ingredientes estándares en % en peso):

- 77% de leche desnatada estándar (3,64% de proteínas de la leche)
- 9,6% de nata pasteurizada
- 5,7% de leche desnatada concentrada
- 0,6% de proteínas de leche desnatada
- 6,6% de sacarosa
- 0,5% de dextrosa (Cargill)
- Fermento de DN-114 001 (CNCM I-1518): 10^8 - 10^9 CFU/ml
- Fermento que consiste en varias cepas comerciales de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* a poblaciones globalmente de 10^7 CFU/ml a 10^9 CFU/ml.

Las preparaciones de frutas tradicionales, suplementadas con zumo concentrado de extracto de saúco, se añaden

tras el tratamiento térmico al producto lácteo fermentado.

Características del producto acabado:

5 250 mg de sólidos de saúco por 100 g de este producto, es decir, para una dosis unitaria, esto es, 1,47% en peso de sólidos de saúco basado en el peso de sólidos de la dosis unitaria.

Contenido de antociano: 25 mg/100 g, es decir, para una dosis unitaria, esto es, 0,147% en peso de antocianos basado en el peso de sólidos de la dosis unitaria.

10

Población de *L. paracasei*: 10^8 cfu/ml para un producto fermentado de 100 ml.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una combinación de un extracto de saúco y al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* o *Streptococcus thermophilus*, en la que dicha composición no comprende una mezcla de Uncaria Tomentosa, Pau d'Arco, Scutellaria baicalensis y artemisinina.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque la composición comprende una combinación de un extracto de saúco y al menos una cepa de *Lactobacillus paracasei*.
- 10 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque el extracto de saúco contiene antociano entre 0,5 y 25% en peso basado en el contenido de sólidos del extracto, y proteína entre 2 y 10% en peso basado en el contenido de sólidos del extracto.
- 15 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque contiene una cantidad de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus* de entre 1×10^7 a 1×10^{11} CFU/dosis unitaria.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque es un alimento, un suplemento alimenticio o un medicamento.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque es un alimento seleccionado del grupo que consiste en productos lácteos, productos lácteos fermentados, yogures, leches fermentadas, leches infantiles, polvos, pastillas, zumos de vegetales, bebidas y sus mezclas, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en productos lácteos frescos, zumos de frutas y/o de vegetales, o purés de frutas.
- 25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque es un suplemento alimenticio o un medicamento en una forma galénica seleccionada del grupo que consiste en comprimidos tragables, comprimidos masticables, comprimidos efervescentes, cápsulas, pastillas, píldoras, polvos, gránulos, disoluciones o suspensiones orales, y formas de dosificación sublinguales y bucales.
- 30 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque contiene entre 150 mg y 300 mg de sólidos de saúco por dosis unitaria, preferentemente entre 200 mg y 250 mg, y entre 1×10^7 y 1×10^{11} CFU de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. bulgaricus* o *S. thermophilus* por dosis unitaria.
- 35 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización como un medicamento.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para estimular la inmunidad y/o potenciar las defensas inmunitarias y/o para promover una respuesta antiinfecciosa y/o antiinflamatoria.
- 40 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su utilización en el tratamiento y/o en la prevención de síntomas de afecciones de la gripe provocadas en particular por una infección por virus de la gripe.

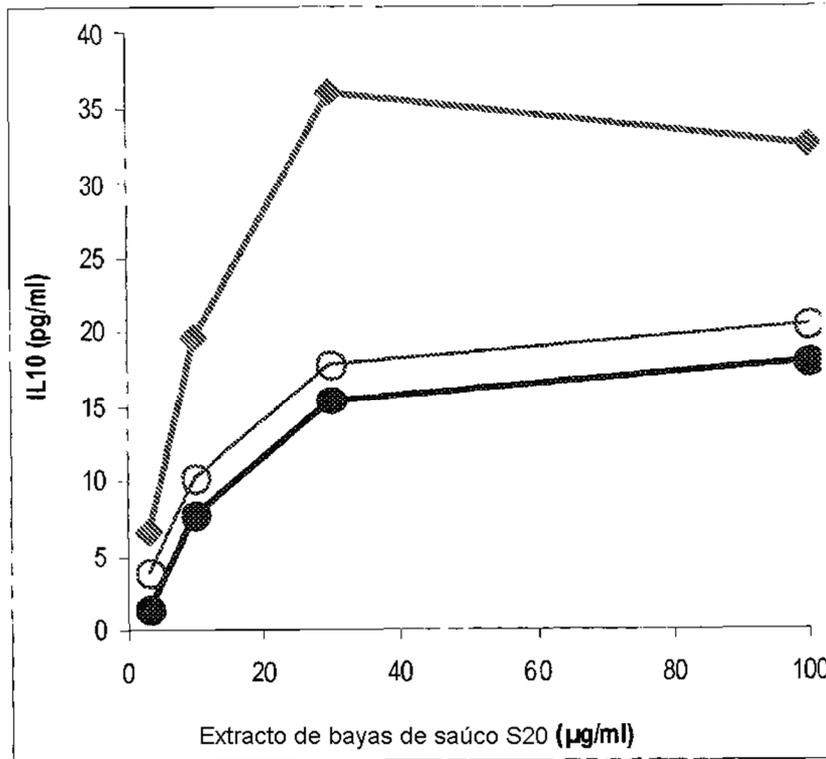


FIG. 1

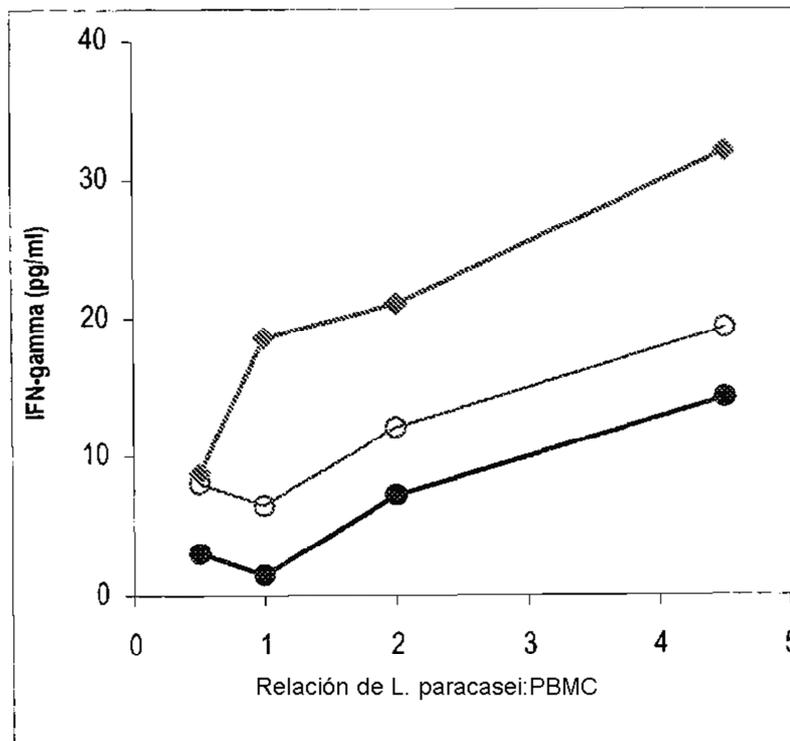


FIG. 2

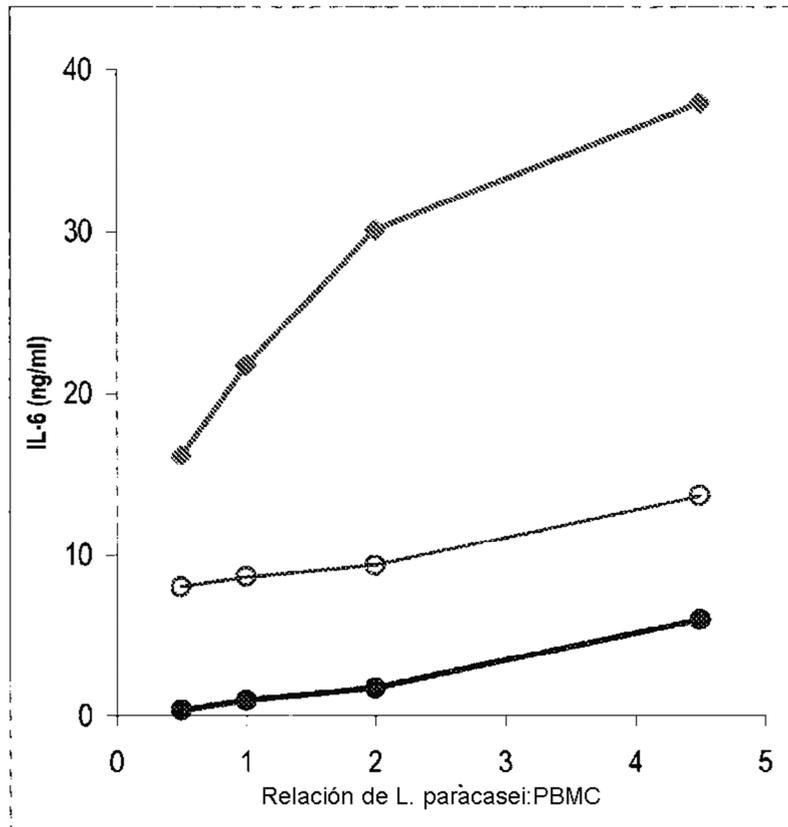


FIG. 3

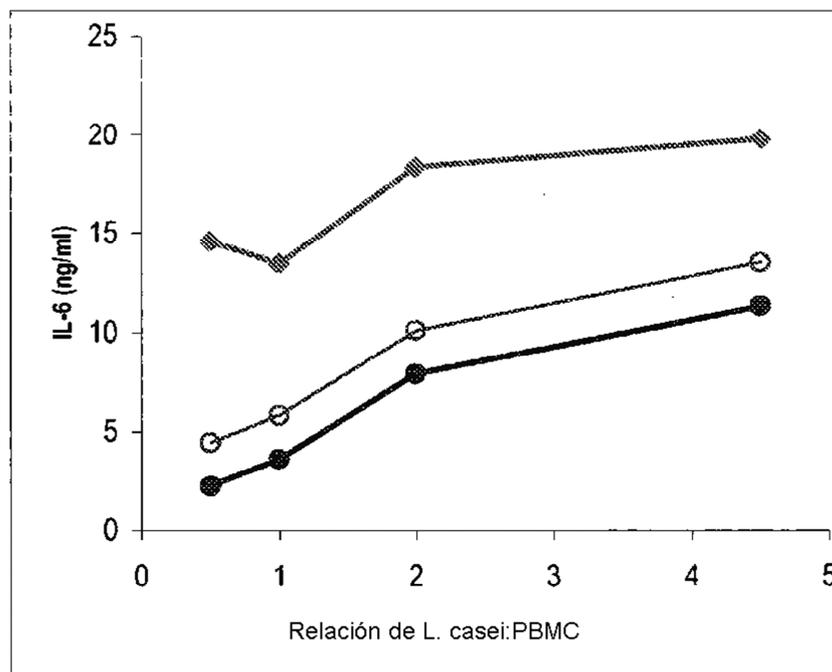


FIG. 4

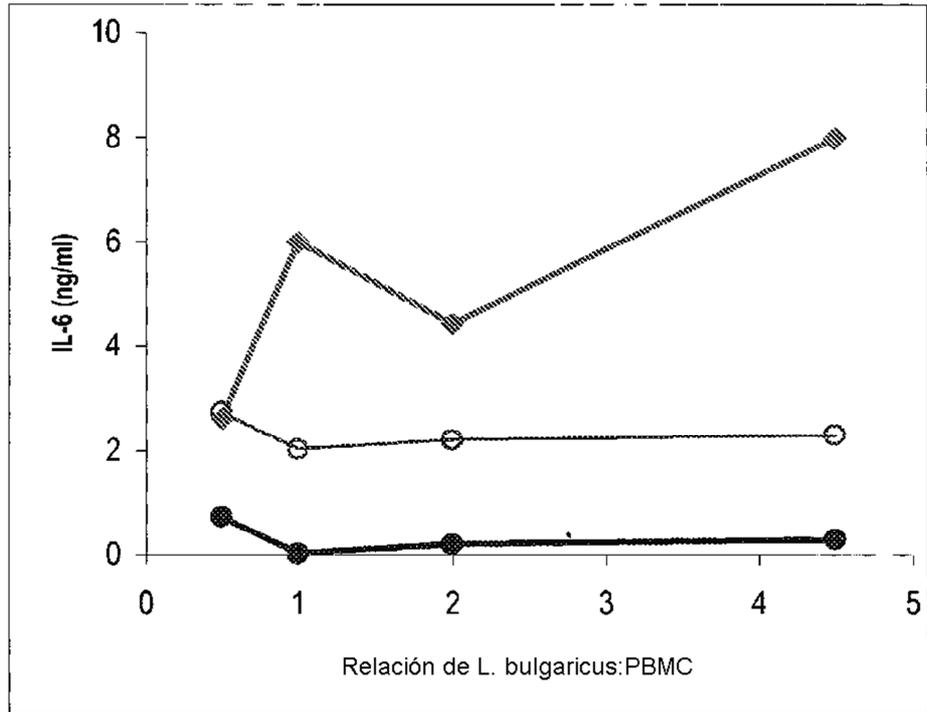


FIG. 5

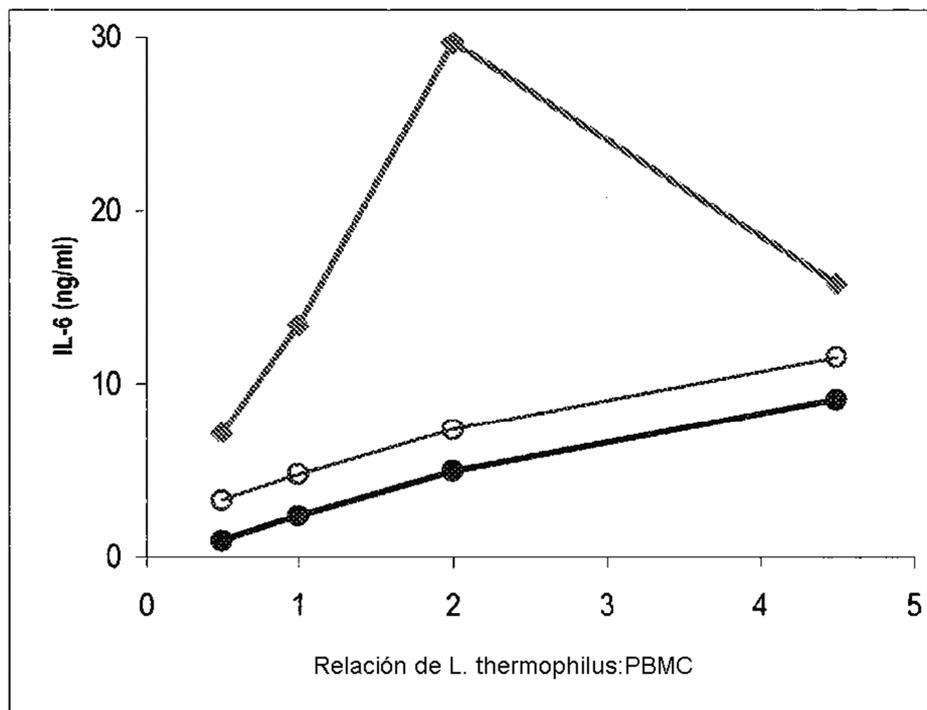


FIG. 6

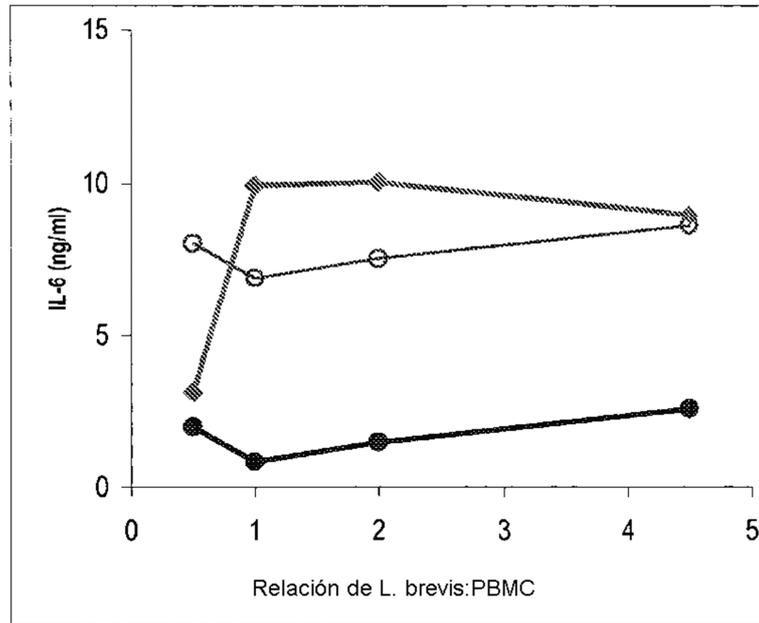


FIG. 7

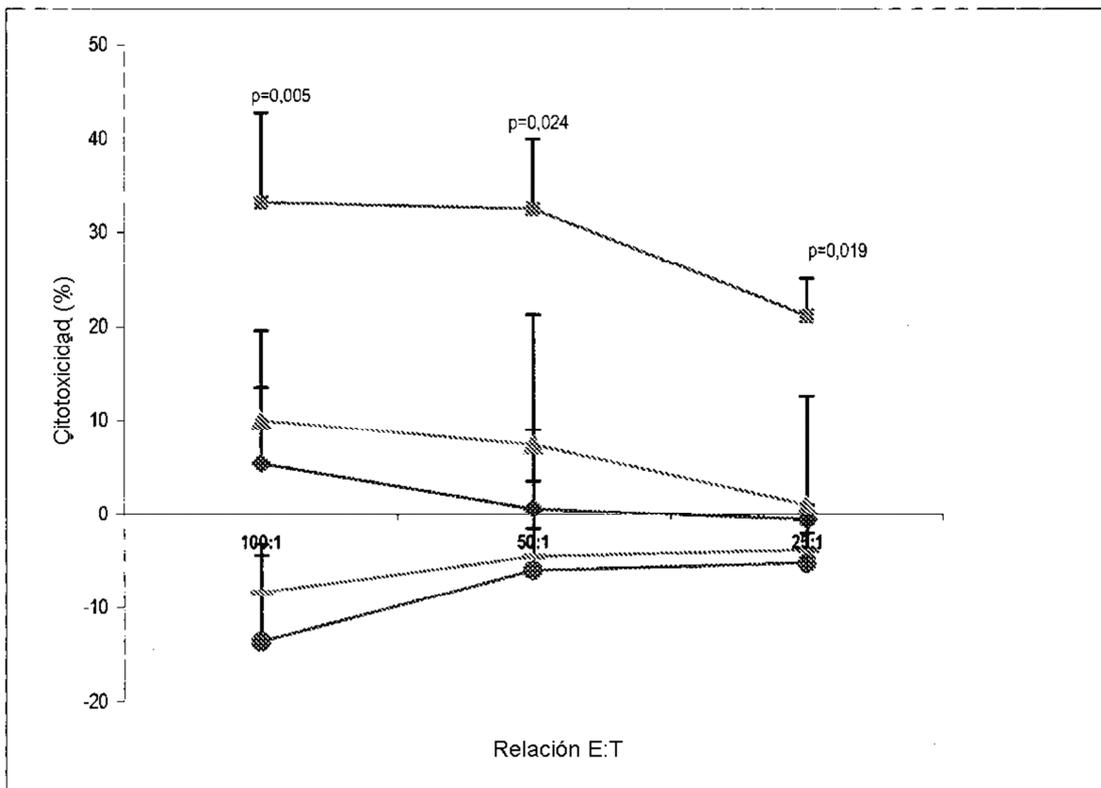


FIG. 8