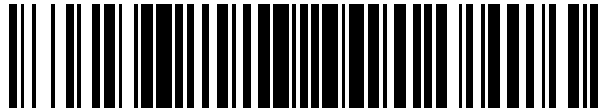


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 891**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

**C12R 1/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2006 E 06799739 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1951273**

54 Título: **Uso de lactobacilus para el tratamiento de enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:

**06.10.2005 SE 0502209**

**07.10.2005 SE 0502250**

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

**14.05.2014**

73 Titular/es:

**PROBI AB (100.0%)  
SÖLVEGATAN 41  
223 70 LÜND, SE**

72 Inventor/es:

**ALENFALL, JAN;  
BERGEN, ANNA;  
RASK, CAROLE;  
WOLD, AGNES y  
AGHAIBEIK-LAVASANI, SHAHRAM**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 460 891 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

Uso de lactobacilus para el tratamiento de enfermedades autoinmunes

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de al menos una cepa bacteriana probiótica seleccionada a partir de *Lactobacillus* para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad autoinmune.

10

**Antecedentes de la técnica**

Las bacterias probióticas se definen como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas tienen un efecto beneficioso sobre el huésped. Lactobacilos y bifidobacterias son las bacterias utilizadas con mayor frecuencia en productos probióticos. Generalmente, estas bacterias son seguras, por eso los probióticos se basan en estos organismos. Esta ausencia de patogenicidad se extiende a todos los grupos de edades y a individuos inmunocomprometidos. Se ha demostrado que la ingestión de diferentes bacterias probióticas tiene beneficios clínicos en diversas situaciones fisiológicas o patológicas. Los efectos de corte más claros se observaron en la diarrea causada por tratamiento con antibiótico o infección por rotavirus. También existen estudios en los que se muestran los efectos clínicos positivos sobre enfermedades intestinales inflamatorias, dermatitis atópicas e hipercolesterolemia tras la ingestión de bacterias probióticas. El mecanismo por el cual las bacterias probióticas contribuyen a estas mejoras clínicas no está claro. Estudios *in vitro* en humanos, así como estudios animales tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que diferentes especies de lactobacilos afectan al sistema inmunológico innato y adquirido de muchas formas diferentes.

25

Los estudios clínicos han mostrado principalmente la estimulación del sistema inmunológico celular innato y la potenciación de las respuestas inmunitarias humorales frente a infecciones naturales y a inmunización sistémica u oral. Con respecto a los efectos del sistema inmunológico innato, se ha descrito un aumento de la actividad fagocítica de las células polimorfonucleares (PMN) y un aumento de la actividad NK de muerte de células tumorales. A nuestro entender, no hay estudios clínicos en los que se muestren los efectos sobre el sistema inmunológico celular específico tras la ingestión de bacterias probióticas.

30

En la presente solicitud se han estudiado exhaustivamente, entre otras cosas, los efectos sobre el sistema inmunológico innato y adquirido tras la ingestión diaria de lactobacilos o la bacteria gram positiva *P. lundensis*. Curiosamente, se ha observado una activación del sistema inmunológico celular específico en sujetos que recibieron *L. plantarum* e indicaciones de esto en sujetos que recibieron *L. paracasei*. Además, en los sujetos que recibieron diferentes especies de lactobacilos se observaron efectos de potenciación de la inmunidad sobre el sistema inmunológico innato, como la expansión de la población de células NKT y el aumento de la actividad fagocítica. La ingestión de la bacteria gram negativa *P. lundensis* no tenía efectos, en absoluto, sobre los diferentes parámetros inmunológicos medidos en este estudio.

35

40

Un problema en aumento en el mundo occidental son las enfermedades autoinmunes o relacionadas con la autoinmunidad donde el sistema inmunológico del individuo humano se ataca a sí mismo por error y el individuo puede caer muy enfermo. Las enfermedades autoinmunes pueden afectar al tejido conjuntivo y a muchas otras partes del organismo tales como órganos específicos como la piel, los nervios, el cerebro, los pulmones, los riñones y las articulaciones. Un ejemplo de enfermedad autoinmune en los nervios y el cerebro es la esclerosis múltiple y en la piel un ejemplo es la psoriasis. Las enfermedades autoinmunes toman muchas formas diferentes y también hay muchos tratamientos para ellas. El tratamiento depende del tipo de enfermedad y del órgano afectado.

45

Existe la necesidad dentro de la técnica de aliviar y tratar los síntomas relacionados con las enfermedades autoinmunes, así como proporcionar un tratamiento preventivo antes de que se desarrolle la enfermedad. Estos problemas son el tema de la presente invención que será aparente a partir de la siguiente descripción.

50

**Resumen de la invención**

55

Un objeto de la presente invención es el uso de al menos una cepa bacteriana probiótica seleccionada a partir de *Lactobacillus* para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad autoinmune.

60

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, en el que se administra a un individuo al menos una cepa bacteriana probiótica seleccionada a partir de *Lactobacillus*.

**Breve descripción de los dibujos**

65

En la figura 1 se muestra el número de voluntarios que refirieron cualquier efecto gastrointestinal adverso menor durante el ensayo clínico.

En la figura 2 se muestran los valores iniciales (día 0) de diferentes linfocitos por ml de sangre (medias  $\pm$  (EMT))

5 En la figura 3 se muestran los porcentajes iniciales (día 0) o la MGIF (media  $\pm$  (EMT)) de linfocitos positivos para la activación de diferentes células y marcadores de memoria.

10 Figura 4. Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a nueve grupos diferentes del estudio. El ensayo clínico se inició con un periodo de lavado de dos semanas. A continuación, siguió el periodo activo del estudio. Durante este periodo, los sujetos consumieron una dosis del producto del estudio al día durante 14 días (grupos de *L. plantarum* Heal 19, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* y *P. lundensis*) o 35 días (grupos de *L. plantarum* 299v y placebo). Cada dosis contenía  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) (grupos de lactobacilos) o  $10^9$  UCF de bacterias (grupo de *P. lundensis*).

15 Figura 5. Los porcentajes de linfocitos que expresan los fenotipos de activación CD8CD25, CD8HLA-DR, CD4CD25 y CD4HLA-DR se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran las medias por grupo ( $\pm$ ETM) en función de los cocientes individuales, día 14/día 0 y día 35/día 0 (solo para el grupo de *L. plantarum* 299v y el placebo).

20 Figura 6. Los porcentajes de linfocitos que expresan los fenotipos de memoria CD8CD45RO y CD4CD45RO se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran las medias por grupo ( $\pm$ ETM) en función de los cocientes individuales, día 14/día 0 y día 35/día 0 (solo para el grupo de *L. plantarum* y el placebo).

Figura 7. Los porcentajes de linfocitos positivos para los marcadores de células NKT (CD56CD16CD3) se analizaron mediante citometría de flujo. Los cálculos por grupos se basan en los cocientes individuales (día 14/día 0).

25 Figura 8. La actividad fagocítica de los neutrófilos se analizó incubando las células de sangre completa con *E. coli* o *S. aureus* marcado con FITC. El cociente entre los valores medios de fluorescencia el día 14 y el día 0 se determinó individualmente y en esta figura se muestran los cálculos por grupo.

30 En la figura 9 se muestra el tratamiento profiláctico del desarrollo de EAE, peso corporal y los síntomas clínicos (experimento 3).

En la figura 10 se muestra el tratamiento terapéutico de la inflamación crónica en el tratamiento de la EAE iniciado el día posterior a su aparición (experimento 3).

35 En las figuras 11 y 12 se muestra el retraso en la aparición de EAE administrando *L. paracasei* 8700:2 o *L. plantarum* HEAL 9 en comparación con el control.

40 En la figura 13 se muestra que la EAE se suprimía mediante una mezcla de las cepas probióticas *L. paracasei* 8700:2, *L. plantarum* HEAL 9 y *L. plantarum* HEAL 19. Además se muestra que el efecto de supresión se interrumpía eliminando las células T CD4+.

En la figura 14 se muestra que la EAE se suprimía mediante una mezcla de *L. paracasei* 8700:2, *L. plantarum* HEAL 9 y *L. plantarum* HEAL 19 en comparación con el control, metotrexato y *L. delbrueckii*.

45 En la figura 15 se muestra el cociente de linfocitos que expresan los fenotipos de activación CD4CD25 a partir del experimento 2.

50 En la figura 16 se muestra el cociente de linfocitos que expresan los fenotipos de activación CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> a partir del experimento 2.

En la figura 17 se muestra el cociente de linfocitos que expresan los fenotipos de activación CD8+HLA-DR+ a partir del experimento 2.

55 En la figura 18 se muestra el cociente de linfocitos que expresan los fenotipos de activación CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a partir del experimento 2.

En la figura 19 se muestra el cociente de linfocitos que expresan los fenotipos de activación CD4CD95R0 del experimento 2.

## 60 Descripción detallada de la invención

65 En una realización de la invención al menos una cepa bacteriana probiótica seleccionada a partir de *Lactobacillus* se usa en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmune seleccionada entre una autoinmunidad específica de órgano seleccionada a partir de esclerosis múltiple (EM), soriasis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, diabetes mellitus de tipo I o lupus sistémico.

En el presente contexto la expresión «tratamiento y/o prevención» incluye un tratamiento profiláctico de un individuo, es decir, el tratamiento con la bacteria probiótica se inicia antes de que se desarrolle la enfermedad para prevenirla así como un tratamiento de una enfermedad que ya se ha desarrollado en un individuo. En este último caso, se espera, por ejemplo, un alivio de los síntomas o que se potencie el estado general del paciente o este se cure de la enfermedad. Por tanto, el individuo puede ser una persona en riesgo de desarrollar o no una enfermedad autoinmune, o es ya un paciente enfermo.

El *Lactobacillus* utilizado según la descripción puede seleccionarse, pero sin limitaciones, a partir del grupo compuesto por *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus gasseri*.

Otras cepas de bacterias probióticas, distintas a las que se describen explícitamente en este documento, pueden utilizarse de forma natural según la presente descripción siempre que proporcionen los efectos deseados, es decir, tengan un efecto preventivo sobre una enfermedad autoinmune o los síntomas de una enfermedad autoinmune.

El *Lactobacillus plantarum* utilizado según la invención puede seleccionarse, pero sin limitaciones, a partir del grupo compuesto por *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316.

El *Lactobacillus paracasei* utilizado según la descripción puede seleccionarse, pero sin limitaciones, a partir del grupo compuesto por *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434 y *Lactobacillus paracasei* 02A, DSM13432.

El *Lactobacillus gasseri* utilizado según la descripción puede seleccionarse, pero sin limitaciones, a partir de *Lactobacillus gasseri* VPG44, DSM 16737.

En otra realización de la invención se usan al menos dos cepas probióticas según se definió anteriormente para el tratamiento y/o prevención de dicha enfermedad autoinmune.

En la realización donde se usan al menos dos cepas probióticas para el tratamiento pretendido, se pretende que al menos dichas dos cepas se administren de forma secuencial o simultánea. Por tanto, las cepas pueden administrarse en una mezcla en una composición o puede administrarse en una secuencia independientemente en diferentes composiciones.

En una realización adicional de la invención dicha composición farmacéutica es una formulación líquida o una formulación sólida en la que dicha formulación sólida se selecciona a partir del grupo compuesto por comprimidos, comprimidos para chupar, caramelos, comprimidos masticables, chicles, cápsulas, sobres, polvos, granulados, partículas recubiertas y comprimidos recubiertos, comprimidos y cápsulas gastroresistentes y tiras y películas dispersables y dicha formulación líquida se selecciona a partir del grupo compuesto por soluciones orales, suspensiones, emulsiones y jarabes.

Aún en una realización adicional de la invención dicha composición comprende un material vehículo, en el que dicho material vehículo se selecciona independientemente, pero sin limitaciones, a partir del grupo compuesto por papilla de harina de avena, alimentos fermentados con ácido láctico, almidón resistente, fibras alimentarias, hidratos de carbono y proteínas glucosiladas.

En una realización adicional de la invención, dicha composición farmacéutica se selecciona, pero sin limitaciones, a partir de un alimento médico, un alimento funcional, un suplemento alimenticio, un producto nutritivo o una preparación alimenticia. Por tanto, la expresión «composición farmacéutica» según se utiliza en este documento no significa necesariamente una composición farmacéutica en su sentido normal como un medicamento, sino que también puede ser un producto dentro del campo de los alimentos médicos, alimentos funcionales, suplementos alimenticios, productos nutritivos y productos alimenticios. Cuando se trata de un producto alimenticio, puede seleccionarse, pero sin limitaciones, a partir de bebidas, yogures, zumos, helados, panes, galletas, cereales, barritas energéticas y alimentos para untar.

Por tanto, el uso de una composición según la invención puede ser muy beneficioso en el sentido de ser útil desde un punto de vista profiláctico, es decir, antes de que se desarrolle la enfermedad autoinmune. Puesto que la composición farmacéutica utilizada no es necesariamente un medicamento en un sentido normal, sino que también puede ser un suplemento alimenticio o un alimento funcional, es muy conveniente para un individuo sano normal tomar la composición de la invención de forma profiláctica.

En una realización de la invención, cada una de las cepas se presenta en la composición en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  UFC, preferiblemente de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  y, más preferiblemente de aproximadamente  $1 \times 10^9$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$ .

La composición farmacéutica según la invención también puede comprender otras sustancias, como un vehículo

inerte, o adyuvantes, vehículos, conservantes, etc., farmacéuticamente aceptables que son todos bien conocidos por los expertos en la materia.

### Ejemplos

5

#### Ejemplo 1

#### Sujetos y criterios del ensayo clínico

10 Se seleccionaron 57 voluntarios aparentemente sanos dentro del intervalo de edad de 18 a 55 años (mediana de 26 años) para este estudio ciego controlado con placebo. Los sujetos se asignaron aleatoriamente a ocho grupos, que recibieron cada una de las siguientes bacterias gram positivas: *L. plantarum* 299v (n=7), *L. plantarum* Heal 19 (n=7), *L. fermentum* 35D (n=7), *L. paracasei* 8700:2 (n=7), *L. gasseri* VPG44 (n=7), *L. rhamnosus* 271 (n=7) o la bacteria gram negativa *P. lundensis* (n=7) o placebo (n=10). La dosis de bacterias era de  $10^{10}$  bacterias/día para los lactobacilos y  $10^9$  bacterias/día para *P. lundensis*. El grupo control tomó leche desnatada en polvo (1 g).  
15 Dependiendo del grupo, el estudio tenía un periodo de duración de 6 o 9 semanas que consistía en dos semanas de periodo de lavado, 2 o 5 semanas de periodo de estudio activo y 2 semanas de periodo de seguimiento (fig. 4). A cada sujeto se le administró una lista de productos que contenían productos probióticos, que no debían consumirse durante todo el periodo del estudio. Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los sujetos mediante  
20 venopunción en dos o tres puntos temporales, el día 0, el día 14 y el día 35. Durante el ensayo clínico se llevó un diario en el que cada sujeto indicó los efectos adversos, el estado de salud y la confirmación de la ingestión del producto del estudio.

#### Citometría de flujo

25

El análisis fenotípico de los linfocitos en sangre completa se realizó mediante citometría de flujo. Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales antihumanos como marcadores de superficie para diferentes poblaciones celulares: CD3 FITC (SK7), CD4 APC (SK3), CD8 PerCP (SK1), CD19 PerCP (SJ25C1), CD56 PE (MY31), CD16 PE (B73.1) y CD5 FITC (L17F12). Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales antihumano para la detección  
30 de diferentes marcadores de activación y de memoria: CD25 FITC (2A3), HLA-DR PE (L243), CD45RO PE (UCHL-1), CD38 PE (HB7), CD27 PE (L128) y CD11b PE (D12). Todos los anticuerpos se obtuvieron de Becton-Dickinson (Erembodegum, Bélgica). La sangre completa (100 µl) se incubó con los anticuerpos (10 µl/anticuerpo) durante 30 min a 4°C en oscuridad. A continuación se añadieron 2 ml de solución de lisis para FACS (Becton-Dickinson) y se incubó durante 15 min a 20°C en oscuridad. Las células se lavaron añadiendo 3 ml de FACSFlow y se centrifugaron  
35 a 300 x g durante 5 min. Las células lavadas se resuspendieron en 200 µl de FACSFlow y se analizó en un FacsCalibur (Becton-Dickinson) con el software CellQuest.

#### Ensayo de fagocitosis

40 La actividad fagocítica de los granulocitos y monocitos se cuantificó con PHAGOTEST® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) según las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, se añadieron  $20 \times 10^6$  bacterias *E. coli* marcadas con FITC o *S. aureus* marcadas con FITC a sangre completa previamente enfriada (100 µl). Las células sanguíneas y las bacterias se incubaron a 37°C para 10 FacsCalibur con el software  
45 CellQuest.

#### Cálculos

Las variaciones individuales con respecto a diferentes parámetros inmunológicos se determinaron calculando el cociente entre los valores individuales obtenidos a día 14 y a día 0, o los valores a día 35 y a día 0. Estos cocientes  
50 se usaron para realizar los cálculos y la estadística de todos los grupos.

#### Estadística

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Stat-view. Se usó la prueba U de Mann-Whitney para  
55 comparar diferentes grupos.

## RESULTADOS

#### Observaciones clínicas

60

Completaron el estudio 54 de los 57 voluntarios. Se excluyó a dos personas debido a una infección y al tratamiento con antibióticos (uno del grupo de placebo y otro del grupo que recibió *P. lundensis*). Se excluyó a una persona el día 16 debido a que estaba embarazada (grupo de placebo). Solo se notificaron efectos secundarios gastrointestinales adversos leves tras la ingestión de productos del estudio (fig. 1).  
65

La ingestión de lactobacilos activa a las células T

Se observaron grandes variaciones individuales iniciales (día 0) con respecto a los marcadores de activación de células T CD4+ y CD8+. Los porcentajes iniciales de células que expresaban los diferentes marcadores celulares de superficie se muestran en la fig. 2. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos en este punto temporal. Puesto que se observaron enormes variaciones interindividuales, se optó por comparar los valores del cociente a día 14 y a día 35 en comparación con el día 0 para cada individuo. Todos los cálculos y comparaciones se realizaron en base a estos valores del cociente (día 14/día 0 y día 35/día 0). Después de 14 días de ingestión del producto del estudio que contenía *L. plantarum* 299v se observó un aumento de aproximadamente el doble en la expresión del marcador de activación CD25 sobre las células T CD8+ ( $p=0,01$ ) (fig. 5). También se observó una fuerte, aunque no significativa ( $p=0,12$ ), indicación de regulación por incremento de HLA-DR en células CD8+ tras la ingestión de *L. plantarum* 299v. Además, también se observó una tendencia a la activación de células T CD4+ tras la ingestión de *L. plantarum* 299v. La ingestión de las otras especies de lactobacilos incluidas en este estudio, así como la bacteria gram negativa *P. lundensis* no activaba a las células T CD8+ ni a las CD4+. Sin embargo, se observó una tendencia a que la ingestión de *L. paracasei* aumentara la expresión de HLA-DR en células T CD4+ ( $p=0,18$ ).

#### La ingestión de lactobacilos induce un fenotipo de memoria de células T CD4+

Las medias geométricas de la intensidad de fluorescencia (MGIF) de la expresión de CD45RO en células T CD4+ y CD8+ se compararon entre grupos que recibieron diferentes productos del estudio. Como anteriormente, los cálculos de grupo basados en los valores individuales del cociente (día 14/día 0 y día 35/día 0) se usaron para las comparaciones. Después de 35 días de ingestión del producto del estudio que contenía *L. plantarum* 299v, aumentaba de forma significativa la MGIF de CD45RO en células T CD4+ ( $p=0,03$ ). También se observó una tendencia al aumento de la expresión de CD45RO en células T CD8+ tras la ingestión de *L. plantarum* (fig. 6). Además, la ingestión de *L. paracasei* parecía tener un efecto positivo sobre la regulación por incremento de CD45RO en células T CD8+ ( $p=0,10$ ) (fig. 6).

#### Efecto sobre diferentes poblaciones celulares tras la ingestión del producto del estudio

Tras la ingestión de *L. paracasei* se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos identificados como células NKT ( $p=0,06$ ) (fig. 7). No se pudo detectar un aumento/disminución relativo en comparación con el día 0 con respecto a otras poblaciones celulares como células T CD4+, células T CD8+, células B, células B-1 (CD19+CD5+), células NK, granulocitos y monocitos.

#### Actividad fagocítica

Los granulocitos y monocitos se identificaron en el diagrama FSC-SSC. Se analizó la capacidad de estas células para fagocitar bacterias gram positivas o gram negativas marcadas con FITC. Como se muestra en la fig. 8, los granulocitos de voluntarios a los que se administró *L. plantarum* 299v ( $p=0,064$ ), *L. plantarum* Heal 19 ( $p=0,064$ ), *L. fermentum* ( $p=0,064$ ) o *L. paracasei* ( $p=0,05$ ) eran más eficaces que los granulocitos de los voluntarios tratados con placebo en la fagocitosis de la bacteria gram negativa *E. coli*. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos en la fagocitosis de la bacteria gram positiva *S. aureus*. No pudieron detectarse diferencias en la actividad fagocítica de los monocitos (datos no mostrados).

#### Discusión

El principal cometido del sistema inmunológico es reaccionar rápida y violentamente frente a microorganismos previniendo y curando de este modo las infecciones. Para matar los microorganismos se emplean poderosos mecanismos que también pueden dañar nuestros propios tejidos. Por tanto, es necesario que no reaccionen con nuestros tejidos ni que haya sustancias nocivas en el entorno. Así, el sistema inmunológico desarrolla y mantiene la tolerancia tanto a los componentes de nuestro propio organismo como a alimentos y proteínas inhaladas. Si esto falla, pueden aparecer varias enfermedades. Los medios para desarrollar tolerancia inmune específica son una tarea esencial del sistema inmunológico.

Las células T colaboradoras tienen una función principal en todas las reacciones inmunitarias. Cuando una célula T colaboradora es activada por su antígeno específico, esta se activa, divide, madura y produce una variedad de citoquinas que dirigen la acción de otros tipos de células en el sistema inmunológico, como células T citotóxicas y células B. La activación de las células T colaboradoras es necesaria para producir la mayor parte de los tipos de reacciones inmunitarias, incluyendo la producción de anticuerpos. Por el contrario, si se evita la activación de las células T colaboradoras, se paralizan la mayoría de los tipos de reacciones inmunitarias.

Existen varios mecanismos por los que se asegura la activación de las células T colaboradoras y el mantenimiento de la tolerancia. Un mecanismo es la eliminación de las células T del timo con capacidad para reconocer y reaccionar con el tejido propio. Sin embargo, esta eliminación no es completa y, además, también es necesario desarrollar tolerancia inmunológica específica a antígenos exógenos. Por otro lado, el organismo puede reaccionar violentamente a todos los tipos de sustancias inhaladas e ingeridas, lo que produce una inflamación masiva y un

despilfarro de los recursos inmunológicos.

Un tipo de célula que es crucial para el mantenimiento de la tolerancia es la célula T reguladora. Este tipo de célula puede reconocerse mediante determinados marcadores, como la expresión superficial de CD4 y CD25, la posesión de CTLA-4 intracelular y la transcripción de la proteína nuclear Foxp3. Las células T reguladoras son capaces de evitar que se activen otras células T cuando se encuentran con sustancias nocivas y, por tanto, prevenir todo tipo de reacción inmunitaria no deseada.

En el presente contexto, el símbolo «+» en relación con un determinado marcador, como CD4+ y CD25+, significa que el marcador se expresa en la célula T. Por ejemplo, las células CD4+CD25+ son células T que expresan tanto el marcador CD4 como el marcador CD25 en su superficie. Sin embargo, esto no indica nada sobre la cantidad de marcador que se expresa, solo que está presente. En el presente contexto, el símbolo «++» en relación con un marcador, como CD4++ y CD25++, significa que el marcador se expresa mucho. Las células T reguladoras son aquellas células con una alta expresión de CD25 en la superficie, es decir, células CD4+CD25++. Por otro lado, las células T CD4+CD25+ son solo células T activadas. A veces, los símbolos específicos «+» y «++» no se usan, por ejemplo, solo CD4CD25, y esto significa que las células están activadas como células CD4+CD25+. Por tanto, CD4CD25 es lo mismo que CD4+CD25+. Cuando se describen las células T reguladoras, siempre se escriben como células CD4+CD25++.

Este estudio ciego controlado con placebo es exclusivo porque es el primer estudio en el que se compara la influencia de diversos parámetros inmunológicos tras la ingestión de diferentes bacterias lactobacilos gram positivas o la bacteria gram negativa *P. lundensis*. De manera interesante, la ingestión de *P. lundensis* no influía sobre ninguno de los parámetros medidos. Por el contrario, la ingestión de lactobacilos afectaba a diferentes componentes tanto del sistema inmunológico específico como innato. Un nuevo hallazgo en este estudio era que la ingestión de *L. plantarum* tenía un pronunciado efecto positivo sobre la activación e inducción de células de memoria en las poblaciones de células T. Se observó una regulación por incremento significativa de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25) y una fuerte tendencia a la regulación por incremento de HLA-DR en las células T citotóxicas. También se observó una tendencia a la regulación por incremento de estos marcadores de activación en las células T colaboradoras tras la ingestión de *L. plantarum*. La expresión de marcadores de activación indica que las células T han empezado a proliferar en respuesta a estímulos específicos o no específicos de antígeno y que estas células ejercen más fácilmente sus funciones efectoras en comparación con las células T en reposo. Los mecanismos que subyacen a la activación inducida por *L. plantarum* de las células T podrían actuar a través de las células presentadoras de antígenos que se activan a través de receptores de tipo toll unidos a compuestos microbianos. La activación de las células presentadoras de antígeno las hacen más eficaces en la presentación de antígeno a las células T. Además, tanto las células T colaboradoras como las citotóxicas han mostrado varias expresiones de los receptores tipo toll, que probablemente hacen que estas células sean sensibles a la activación inespecífica por componentes y productos microbianos.

En analogía con el compartimento de las células T colaboradoras, la expresión de CD45RO parece indicar una población de memoria también entre las células T citotóxicas. Se encontró un aumento significativo en la expresión de este marcador de células de memoria sobre las células T colaboradoras y una tendencia hacia la regulación por incremento en las células T citotóxicas después de 35 días de la ingestión de *L. plantarum*. Además, la ingestión de *L. paracasei* también mostraba una tendencia hacia la regulación por incremento de CD45RO en las células T citotóxicas. En relación con las células T vírgenes, las células T CD45RO+ pueden secretar una amplia variedad de citoquinas. Además, las células T CD45RO+ pueden proliferar y producir IL-2 cuando el complejo CD3-TCR se estimula en condiciones subóptimas, mientras que las células T vírgenes requieren un fuerte estímulo CD3-TCR para llevar a cabo estas funciones. La formación de células T de memoria es importante para la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz tras la infección y vacunación.

El sistema inmunológico celular innato también se veía afectado por la ingestión de bacterias probióticas. Se demostró que la población de células T citotóxicas naturales (NKT) se expandía tras la ingestión de *L. paracasei*. Las células NKT constituyen una subpoblación de linfocitos que coexpresan el marcador de células NK CD56 y el marcador de células complejo CD3-receptor de células T. Los estudios tanto en humanos como en ratones han demostrado que las células NKT tienen un papel principal en la regulación de enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, diabetes de tipo I y lupus sistémico. Las células NKT también ejercían funciones efectoras contra tumores y células infectadas por virus. Por tanto, las células NKT son pleotrópicas en sus funciones. Otros estudios clínicos en los que se evaluaron los efectos inmunológicos de las bacterias probióticas han mostrado que la ingestión de *L. rhamnosus* HN001 y *Bifidobacterium lactis* HN019 potencia la actividad NK (incluyendo NKT) para matar células tumorales de las células K562. En este estudio también se confirmó que la actividad fagocítica de células polimorfonucleares estaba aumentada tras la ingestión de diferentes lactobacilos. La consecuencia de los efectos observados sobre los diferentes parámetros inmunológicos en el presente estudio es que se podía especular que la coincidente activación de células T citotóxicas y expansión de células NKT apuntan hacia una defensa inmunológica potenciada frente a infecciones víricas y/o tumores. Los hallazgos *in vitro* de que los lactobacilos inducen a las células mononucleares a secretar IL-12 e IL-18, apoyan la teoría de que estas bacterias estimulan la actividad mediada por células.

Según la presente invención se ha concluido que la ingestión de *L. plantarum* y *L. paracasei* tiene un profundo efecto sobre el sistema inmunológico celular específico e innato.

### Ejemplo 2

5 El objetivo de este ejemplo era investigar el efecto sobre el sistema inmunológico administrando las mismas especies de lactobacilos durante un periodo de tiempo más largo en comparación con varios lactobacilos (diferentes especies) administrados de forma secuencial uno después del otro.

10 Los voluntarios recibieron un polvo con las bacterias liofilizadas durante 14 o 35 días. Como bacteria gram positiva se usa la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum* 299v sola o en combinación con *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. paracasei* y *L. gasseri*. Como bacteria gram negativa se administra *Pseudomonas lundensis*. Se estudian los siguientes grupos:

15 1) *Lactobacillus plantarum* 299v 35 días

2) *L. plantarum* 299v 7 días, *L. rhamnosus* 271 7 días, *L. fermentum* 35D 7 días, *L. paracasei* 8700:2 7 días, *L. gasseri* VPG44 7 días. En total 35 días. (Secuencia)

20 3) Una mezcla de *L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* 271, *L. fermentum* 35D, *L. paracasei* 8700:2, *L. gasseri* VPG44. En total 14 días.

4) *L. rhamnosus* 271, 14 días

25 5) *L. fermentum* 35D, 14 días

6) *L. paracasei* 8700:2, 14 días

7) *L. gasseri* VPG44, 14 días

30 8) *Pseudomonas lundensis*, 14 días,

Grupo control 1) placebo, 35 días

35 Grupo control 2) placebo, 14 días

Las muestras de sangre se obtienen los días 0, 14 y 35. La cantidad de células T colaboradoras (CD4+) que expresaban altas cantidades de CD24 se definieron en cada grupo mediante citometría de flujo como se había especificado anteriormente en el experimento 1.

### 40 Resultados

El día 14 se observaron células T CD4+CD25++ al límite de la significación estadística que se expandían en los individuos que consumieron la secuencia de cinco cepas diferentes de lactobacilos.

### 45 Discusión

En otros estudios se ha demostrado que las células T colaboradoras (CD4+) que expresan la molécula CD25 con una alta densidad (CD4+CD25++) son importantes en la protección frente a enfermedades autoinmunes, alergias y enfermedad inflamatorias intestinales. El hallazgo de que estas células se expanden tras la ingestión de una secuencia de diferentes lactobacilos indica que la ingestión de estas bacterias podría ser beneficiosa para el individuo con respecto al riesgo de desarrollar las enfermedades mencionadas anteriormente.

### 55 Ejemplo 3

#### Animales

Los ratones C57BL/6 de ocho semanas de edad se adquirieron en Taconic Europe (Dinamarca). Los animales se mantuvieron y cruzaron en las instalaciones convencionales del estabulario del Departamento de Biología Celular y del Organismo, Universidad de Lund, y todos los experimentos se realizaron de conformidad con el comité ético de Malmö-Lund, Suecia. Los ratones se mantuvieron con acceso libre a dieta normal y agua, y se les dejó un periodo de aclimatación al nuevo entorno durante al menos una semana antes de que se iniciaran los experimentos. Los ratones utilizados en los experimentos de EAE se pesaron, se exploraron los signos clínicos de EAE y se puntuaron según la escala descrita en la evaluación clínica todos los días a lo largo del experimento. Los ratones con una puntuación de 6 se suplementaron una vez al día con 0,5 ml de solución fisiológica salina por vía subcutánea para evitar la deshidratación. El pienso se colocaba en el suelo de la jaula cuando algún ratón mostraba signos de



enfermedad clínica. Los ratones con una puntuación de 7 se sacrificaron por motivos éticos. Los experimentos finalizaron 24 días después de la inmunización.

#### Antígenos

5 Se usó un péptido encefalogénico de la glucoproteína oligodendrocítica mielínica (MOG, por sus siglas en inglés) para inducir EAE (enfalcalomielitis autoinmune experimental) en ratones. El péptido sintético, aminoácidos 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), se adquirió en Schager-N, Copenhague, Dinamarca. El péptido usado estaba puro al 99%.

#### Inmunización

15 La EAE se indujo como se describió anteriormente en ratones C57BL/6 hembra. Brevemente, cada animal se inmunizó anestesiado con isoflurano mediante inyección s. c. en el costado con 100 µl de una emulsión 1:1 de 200 µg de MOG<sub>35-55</sub> en PBS y ACF que contenía *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco, Detroit, MI). Inmediatamente después de esto y 48 h tras la inmunización, se administró a los ratones una inyección intraperitoneal de 0,1 ml de 4 µg/ml de toxina pertussis (Sigma).

#### Evaluación clínica

20 Los signos clínicos de la EAE se puntuaron según una escala de 0 a 8 de la siguiente forma: 0, sin signos de enfermedad clínica; 1, debilidad de la cola; 2, cola paralizada; 3, paresia de las patas traseras y alteración de la marcha; 4, parálisis de una de las patas traseras; 5, parálisis total de las patas traseras con paresia de la parte posterior del cuerpo, el ratón está activo y se mueve usando las patas delanteras; 6, parálisis total de las extremidades inferiores con paresia de la parte posterior del cuerpo y movilidad gravemente alterada; 7, tetraplejía, sin movilidad, estado moribundo; 8, muerte.

#### Cepas bacterianas y tratamiento

30 *L. plantarum* HEAL 9 y *L. paracasei* 8700:2 se obtuvieron en Probi AB (Ideon, Lund, Suecia). Las bacterias se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez y se resuspendieron en agua potable a una concentración final de  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC)/100 ml en una botella. Se preparó una tercera botella con una mezcla de *L. plantarum* HEAL 9 y *L. paracasei* 8700:2 a una concentración final de  $2 \times 10^9$  UFC/100 ml. Las botellas se lavaron y los vehículos que incluían las bacterias se prepararon cada día. Los experimentos se realizaron con diez ratones por grupo de tratamiento. Cada animal bebió 4-5 ml de vehículo/día que incluía aproximadamente  $10^8$  UFC. Los animales control recibieron agua potable.

#### Resultados

40 *El tratamiento probiótico suprimía el desarrollo de la EAE inducida por MOG*

45 Para estudiar el efecto antiinflamatorio de los probióticos, tres grupos de animales se pretrataron con los probióticos *L. plantarum* HEAL 9, *L. paracasei* 8700:2 y una mezcla de *L. plantarum* HEAL 9 y *L. paracasei* 8700:2, durante 12 días y se inmunizaron para desarrollar la EAE con una emulsión de ACF y MOG<sub>35-55</sub> el día 0. Los animales se trataron a continuación a lo largo del experimento completo (hasta el día 24). Un cuarto grupo de animales recibió solo agua potable como control. Como se muestra en la figura 10, el tratamiento con *L. plantarum* HEAL 9 o *L. paracasei* 8700:2 prevenía de forma eficaz el desarrollo de la EAE crónica durante 10 días en comparación con los ratones control que mostraban una EAE grave que se iniciaba el día 11. Los ratones tratados con una mezcla de bacterias también mostraban un retraso de la aparición durante aproximadamente cinco días en comparación con el control. Estos ratones desarrollaron una EAE más grave en comparación con los ratones tratados con una única bacteria. El día 24, la incidencia de animales enfermos se reducía significativamente en el 14% de los animales tratados con una única bacteria en comparación con el 91% de los ratones control. La incidencia en los animales que recibieron una mezcla de bacterias era del 60%. Cuando se analizaron los cambios en el peso de los animales durante el experimento, se demostró sorprendentemente que el tratamiento con una mezcla de dos bacterias inhibía la disminución del peso que normalmente se producía antes de la aparición de la enfermedad (fig. 9). Los animales tratados con una única bacteria habían disminuido de peso con respecto a los ratones control a pesar de que no mostraban signos de parálisis.

#### Tratamiento preventivo de la EAE

60 Los animales fueron tratados con probióticos 12 días antes de la inmunización y durante todo el experimento.

Cada día se preparaban 100 ml de agua para beber que incluía diferentes bacterias.

65 Aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias/ratón/día. Los ratones control recibieron solo agua.

$N_{\text{Plantarum}}=7$ ,  $N_{\text{Paracasei}}=7$ ,  $N_{\text{Mix}}=10$ ,  $N_{\text{Control}}=11$

Los resultados se muestran en la figura 9.

5 Tratamiento terapéutico de la inflamación crónica en la EAE

Tratamiento oral con probióticos un día después de la aparición de la EAE. Los animales se trataron individualmente mediante una aguja gástrica.

10 Aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias/ratón/día. Los ratones control recibieron NaCl estéril a 9 mg/ml.

$N_{\text{Plantarum}}=6$ ,  $N_{\text{Paracasei}}=6$ ,  $N_{\text{Mix}}=8$ ,  $N_{\text{Control}}=8$

Los resultados se muestran en la figura 10.

15

Experimento 4

Supresión de la inflamación crónica en el sistema nervioso central mediante administración oral de *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum*

20

El objetivo de este estudio era examinar si los probióticos podrían afectar a la inflamación crónica mediada por células T en el sistema nervioso central. Los autores plantearon la hipótesis de que el tratamiento oral con probióticos ejerce un efecto antiinflamatorio por modulación inmunológica de las células T efectoras patógenas.

25 Material y procedimientos

*Modelo animal*

30 La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo de enfermedad de animal de esclerosis múltiple se inducirá mediante inmunización con el péptido 35-55 de la glucoproteína mielínica de oligodendrocitos (MOG) en adyuvante completo de Freund. La toxina pertussis también se inyectó en conexión con la inmunización para potenciar adicionalmente las respuestas inflamatorias. Los animales empezaron a mostrar síntomas clínicos después de dos semanas. Los signos de EAE se puntuaron dentro de ocho categorías: 0, sin signos de enfermedad clínica; 1: debilidad en la cola; 2: cola paralizada; 3: paresia y alteración de la marcha; 4: parálisis de un miembro; 5: parálisis de dos miembros; 6: dos miembros paralizados y paresia de un tercer miembro, el ratón sigue siendo capaz de moverse; 7: tetraplejía, sin movilidad y en estado moribundo; 8: muerte.

35

Cepas bacterianas probióticas

40 *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus paracasei defacti*, *Lactobacillus plantarum* Heal 9, *Lactobacillus plantarum* Heal 19, *Lactobacillus plantarum* 299v y *Lactobacillus delbrueckii* fueron proporcionados por Probi AB.

Protocolos de tratamiento

45 *Tratamiento preventivo*: se prepararon nuevos cada día 100 ml de agua para beber que incluían  $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{10}$  bacterias diferentes. Cada ratón bebía aproximadamente 5 ml con  $\approx 1 \times 10^8 = 1 \times 10^9$  bacterias/ratón/día. Los animales se trataron en los 7-14 días previos a la inmunización y durante el resto del experimento. Los ratones control recibieron solo agua. En un experimento reciente, los animales se trataron con agujas gástricas 10 días después de la inmunización cada dos días a lo largo del experimento.

50

*Tratamiento terapéutico*: diez días después de la aparición de la enfermedad, cada animal recibió  $1 \times 10^9$  bacterias mediante tratamiento individual con agujas gástricas, cada dos días a lo largo del experimento. Los ratones control recibieron solución salina.

55 *Metotrexato (MTX)*: el MTX se administró i. p. a una concentración final de 2,5 mg/Kg., cada dos días a lo largo del experimento.

Análisis

60 Se aislaron deferentes órganos y materiales de los animales para su posterior análisis; cerebro, médula espinal, bazo, nódulos linfáticos (mesentéricos, inguinales), intestino (regiones con placas de Peyer) y sangre. Algunos órganos fueron tratados con isopentano para el análisis inmunohistoquímico. Algunas células del bazo y de los ganglios linfáticos se analizaron mediante citometría de flujo (FACS) y se pusieron en cultivo y se estimularon con péptido MOG, anti-CD3 y LPS para estudios adicionales de citoquinas mediante ELISA.

Resultados*Tratamiento preventivo*

5 Los animales se trataron con  $1 \times 10^8$  *Lactobacillus paracasei* 8700:2 o *Lactobacillus plantarum* Heal 19 durante siete días antes de la inmunización. La EAE se suprimió significativamente durante un periodo corto de tiempo.

10 Los animales se trataron con  $1 \times 10^9$  *Lactobacillus paracasei* 8700:2 o *Lactobacillus plantarum* Heal 9 durante doce días antes de la inmunización. El inicio de la EAE se retrasó en más de una semana y tuvo como resultado un desarrollo más leve de la EAE (véanse las figs. 11 y 12).

15 El análisis inmunológico de la médula espinal mostró cantidades significativamente menores de células T inflamatorias en animales tratados con probióticos. El ensayo de proliferación de esplenocitos *in vitro* reveló una proliferación de células T específicas de MOG igual aunque, curiosamente, estas producían cantidades significativamente inferiores de citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y cantidades mayores de IL-4 e IL-10. Los animales tratados con *L. paracasei* mostraron niveles más altos de anticuerpos IgG e IgA en plasma. El análisis por FACS de los ganglios linfáticos mesentéricos mostró un aumento de células T CD4+CD25+. El análisis inmunohistoquímico del bazo mostró un aumento de células Foxp3<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>).

20 *Cribado 1:*

25 Se han seleccionado cinco lactobacilos diferentes (*Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus paracasei* defacti, *Lactobacillus plantarum* Heal 9, *Lactobacillus plantarum* Heal 19 y *Lactobacillus plantarum* 299v) según su capacidad para suprimir la EAE mediante un protocolo de tratamiento profiláctico. La mejor supresión se obtuvo usando *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus plantarum* Heal.9, y *Lactobacillus plantarum* 299v.

Transferencia 1:

30 Los animales se trataron con *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus plantarum* Heal 9 o una mezcla de ambas cepas, durante dos semanas. A continuación se recogieron las células de los ganglios linfáticos mesentéricos y se transfirieron a receptores (i.v.) que fueron inmunizado para la EAE el día después de la transferencia. Las células de los animales tratados con una mezcla de las dos cepas suprimía significativamente la EAE. El efecto de supresión se interrumpía al eliminar las células T CD4+ (véase la fig. 13).

35 Este experimento se repitió de nuevo incluyendo un grupo de animales tratados con una mezcla de tres cepas que incluían *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus plantarum* Heal 9 y *Lactobacillus plantarum* Heal 19.

40 Los animales se inmunizaron para la EAE. Diez días después del desarrollo de la EAE, se trataron individualmente con una mezcla de *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus plantarum* Heal 9 y *Lactobacillus plantarum* Heal 19. La enfermedad EAE establecida se suprimió significativamente en comparación con el control que recibió solución salina. Este experimento se ha repetido con éxito con un resultado similar. El tratamiento con la bacteria inespecífica *Lactobacillus delbruecki* o metotrexato (como fármaco general antiinflamatorio) era ineficaz mostrando el efecto terapéutico exclusivo de este protocolo.

45 Los mecanismos antiinflamatorios de la acción de estos tratamientos sigue siendo desconocido aunque los resultados muestran claramente una función clave de la población de células T reguladoras CD4+CD25+ Foxp3+ (véase la fig. 14).

## REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos una cepa bacteriana probiótica de *Lactobacillus* seleccionada a partir del grupo compuesto por *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434, y *Lactobacillus paracasei*, 02A, DSM13432, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad autoinmune, en el que dicha enfermedad autoinmune es una autoinmunidad específica de órgano elegida entre esclerosis múltiple (EM), psoriasis, artritis reumatoide, diabetes mellitus de tipo I o lupus sistémico.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que se usan al menos dos cepas probióticas para el tratamiento y/o prevención de dicha enfermedad autoinmune.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que se pretende que al menos dichas dos cepas se administren secuencial o simultáneamente.
4. Uso según una cualquier de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha composición farmacéutica es una formulación líquida o una formulación sólida.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que dicha formulación sólida se elige a partir del grupo compuesto por comprimidos, comprimidos para chupar, caramelos, comprimidos masticables, chicles, cápsulas, sobres, polvos, granulados, partícula recubiertas o comprimidos recubiertos, comprimidos y cápsulas gastroresistentes y tiras y películas dispersables.
6. Uso según la reivindicación 4, en el que dicha formulación líquida se elige a partir del grupo compuesto por soluciones orales, suspensiones, emulsiones y jarabes.
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha composición comprende un material vehículo.
8. Uso según una cualquier de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha composición farmacéutica es un alimento médico, un suplemento alimenticio o un producto nutritivo.
9. Uso según la reivindicación 7 u 8, en el que dicho material vehículo se selecciona independientemente a partir del grupo compuesto por almidón resistente, fibras alimenticias, hidratos de carbono y proteínas glucosiladas.
10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que cada una de dichas cepas se presenta en la composición en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  UFC, preferiblemente de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  y, más preferiblemente de aproximadamente  $1 \times 10^9$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$ .
11. Una bacteria probiótica de *Lactobacillus* seleccionada a partir del grupo compuesto por *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434 y *Lactobacillus paracasei*, 02A, DSM13432, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad autoinmune, en el que dicha enfermedad autoinmune es una autoinmunidad específica de órgano elegida entre esclerosis múltiple (EM), psoriasis, artritis reumatoide, diabetes mellitus de tipo I o lupus sistémico.
12. Una bacteria probiótica para su uso según la reivindicación 11, en el que se usan al menos dos cepas probióticas para el tratamiento y/o prevención de dicha enfermedad autoinmune.
13. Una bacteria probiótica para su uso según la reivindicación 12, en el que se pretende que al menos dichas dos cepas se administren secuencial o simultáneamente.

Fig. 1

	Periodo de lavado		Periodo del estudio					Periodo postestudio	
	(semana)		(semana)					(semana)	
	-2	-1	1	2	3	4	5	+1	+2
<i>L. plantarum</i>	0/7	1/7	3/7	2/7	3/7	2/7	1/7	1/7	0/7
<i>L. Heal 19</i>	0/7	1/7	1/7	2/7				2/7	1/7
<i>L. fermentum</i>	0/7	0/7	0/7	0/7				1/7	0/7
<i>L. paracasei</i>	0/7	0/7	1/7	0/7				0/7	0/7
<i>L. gasseri</i>	0/7	0/7	3/7	1/7				4/7	0/7
<i>L. rhamnosus</i>	1/7	1/7	0/7	0/7				1/7	0/7
<i>P. lundensis</i>	1/6	1/6	1/6	1/6				0/6	0/6
Placebo	0/9	0/9	2/9	3/9	1/8	1/8	0/8	0/8	0/8

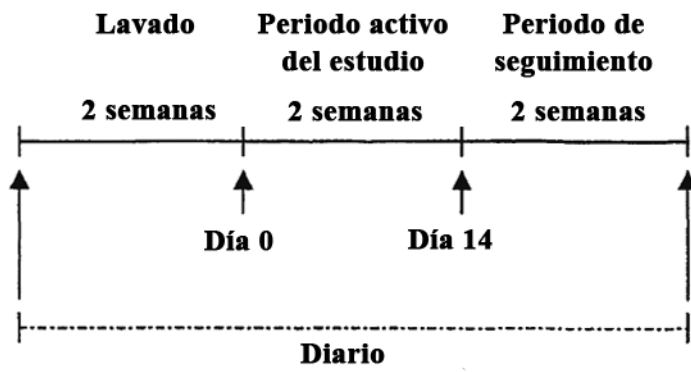
Fig. 2.

	Células T CD4+ (x 10 <sup>3</sup> )	Células T CD8+ (x 10 <sup>3</sup> )	Células NKT (x 10 <sup>3</sup> )
<i>L. plantarum</i>	647 (92)	318 (37)	64 (17)
<i>L. Heal 19</i>	817 (105)	328 (43)	56 (19)
<i>L. fermentum</i>	907 (82)	479 (51)	87 (21)
<i>L. paracasei</i>	794 (87)	321 (64)	98 (21)
<i>L. gasseri</i>	767 (54)	497 (110)	111 (39)
<i>L. rhamnosus</i>	775 (109)	387 (50)	109 (22)
<i>P. lundensis</i>	731 (65)	468 (84)	87 (29)
Placebo	650 (43)	300 (34)	107 (30)

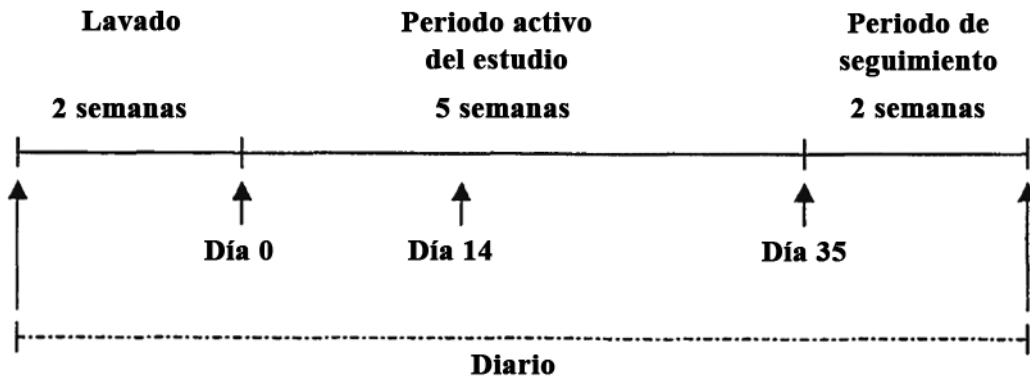
Figura 3.

	% de linfocitos CD4+CD25+	% de linfocitos CD8+CD25+	% de linfocitos CD4+HLA-DR+	% de linfocitos CD8+HLA-DR+	MGIF CD45RO en células T CD4+	MGIF CD45RO en células T CD8+
<i>L. plantarum</i>	10 (0,90)	0,83 (0,19)	4,3 (0,69)	5,0 (1,8)	53 (10)	27 (5,6)
<i>L. Heal 19</i>	17 (2,6)	1,5 (0,40)	4,4 (1,2)	6,6 (3,3)	126 (39)	61 (15)
<i>L. fermentum</i>	15 (0,98)	1,5 (0,31)	4,4 (0,51)	7,0 (1,1)	71 (13)	36 (5,6)
<i>L. paracasei</i>	17 (1,1)	1,7 (0,73)	8,5 (4,7)	6,1 (1,6)	83 (13)	50 (17)
<i>L. gasseri</i>	15 (2,0)	1,3 (0,26)	3,3 (0,60)	5,2 (1,3)	110 (96)	45 (14)
<i>L. rhamnosus</i>	14 (0,60)	1,3 (0,13)	3,0 (0,34)	5,2 (1,3)	80 (24)	40 (11)
<i>P. lundensis</i>	18 (4,1)	4,0 (2,3)	10 (6,7)	9,4 (2,4)	65 (9,4)	38 (3,5)
Placebo	13 (1,0)	2,6 (1,4)	4,2 (0,59)	6,8 (3,5)	39 (8,2)	23 (5,1)

**A**



**B**



**Fig. 4**



Fig. 5

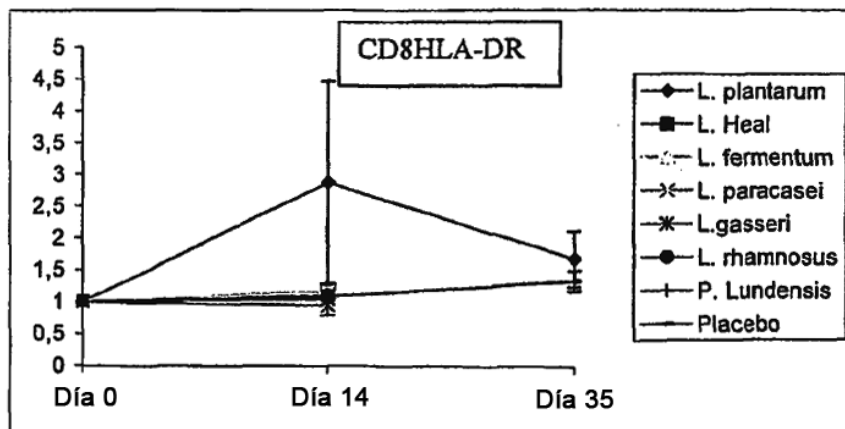
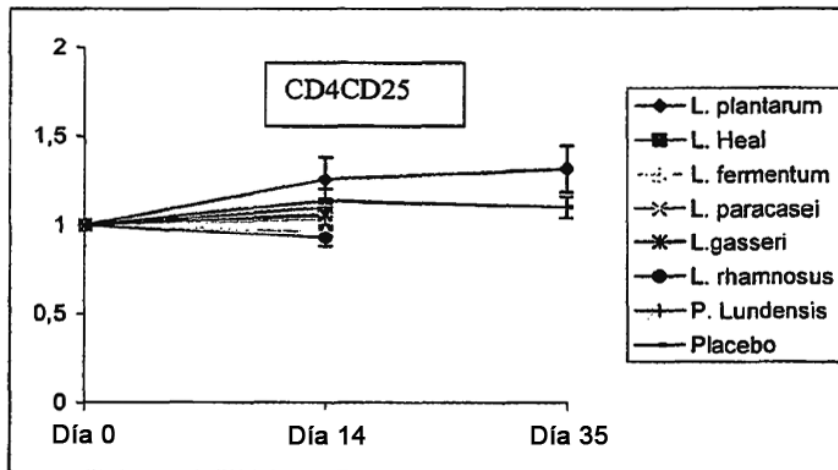
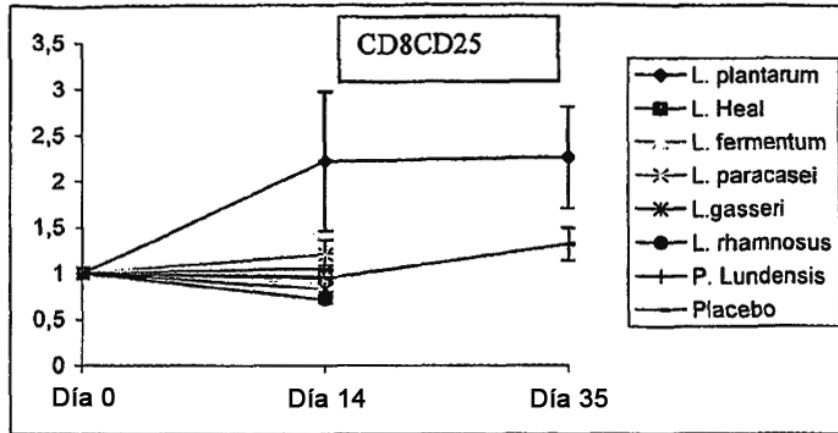


Fig. 5 (continuación)

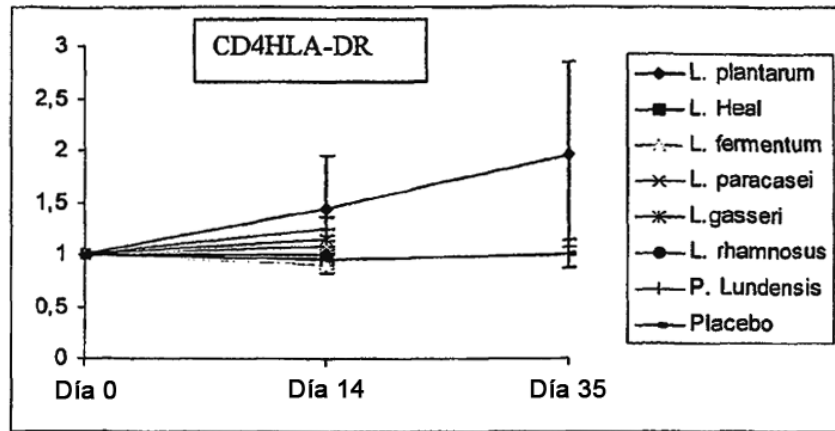
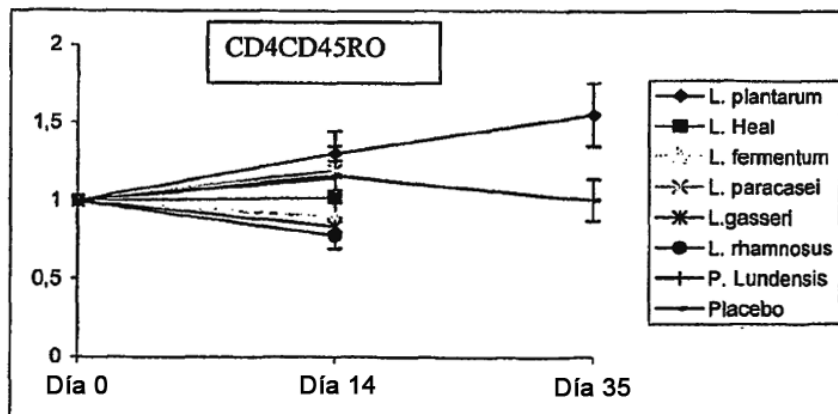
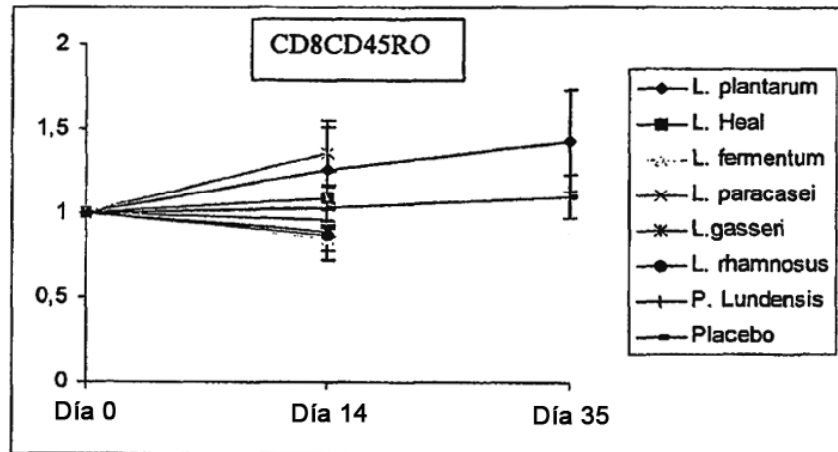


Fig. 6.



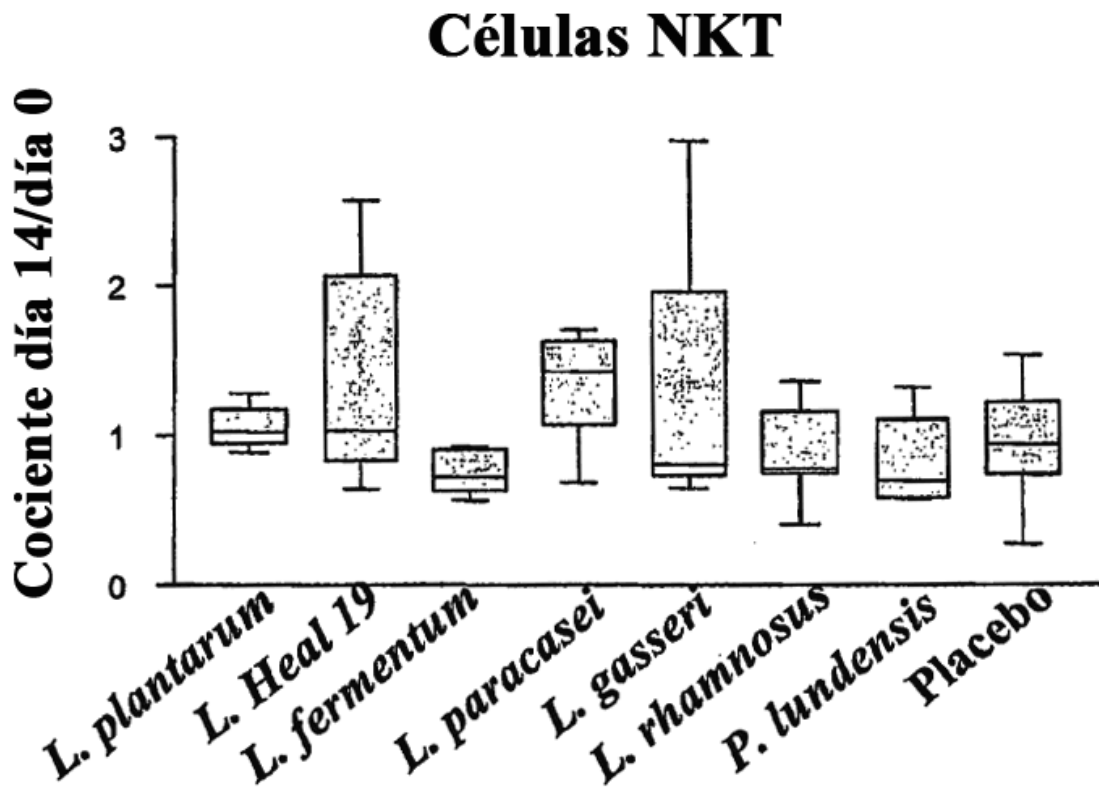


Fig. 7

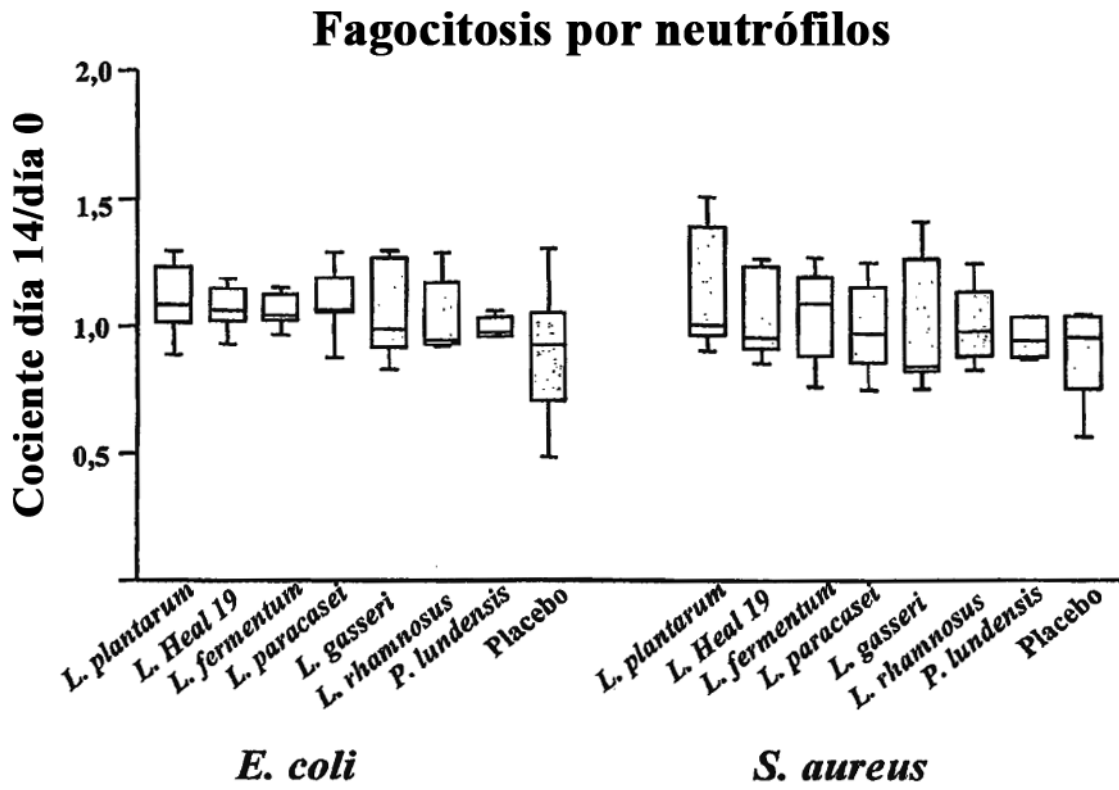


Fig. 8

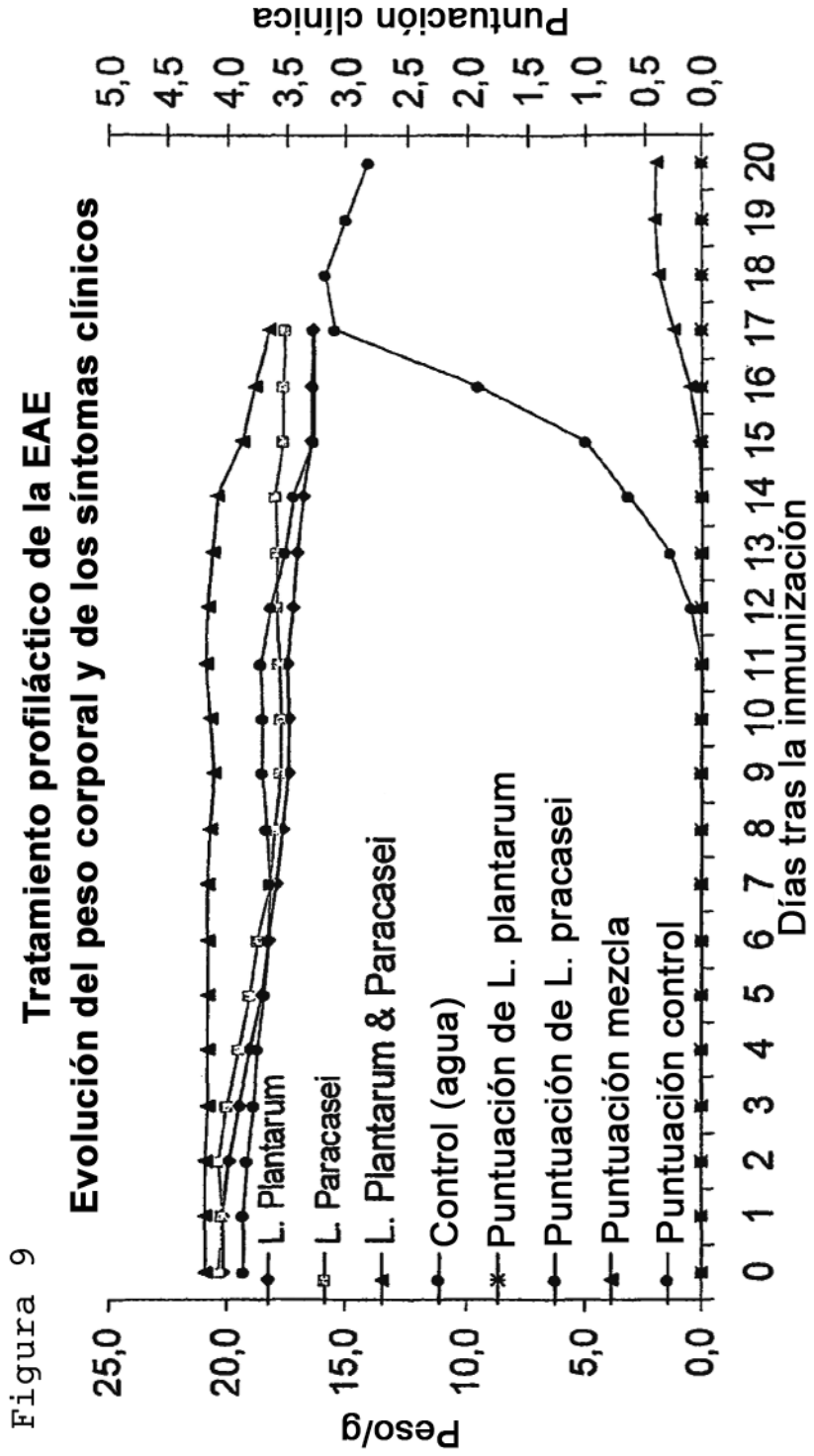


Figura 10

**Tratamiento terapéutico de la inflamación crónica en la EAE  
Tratamiento iniciado un día después de la aparición de la enfermedad**

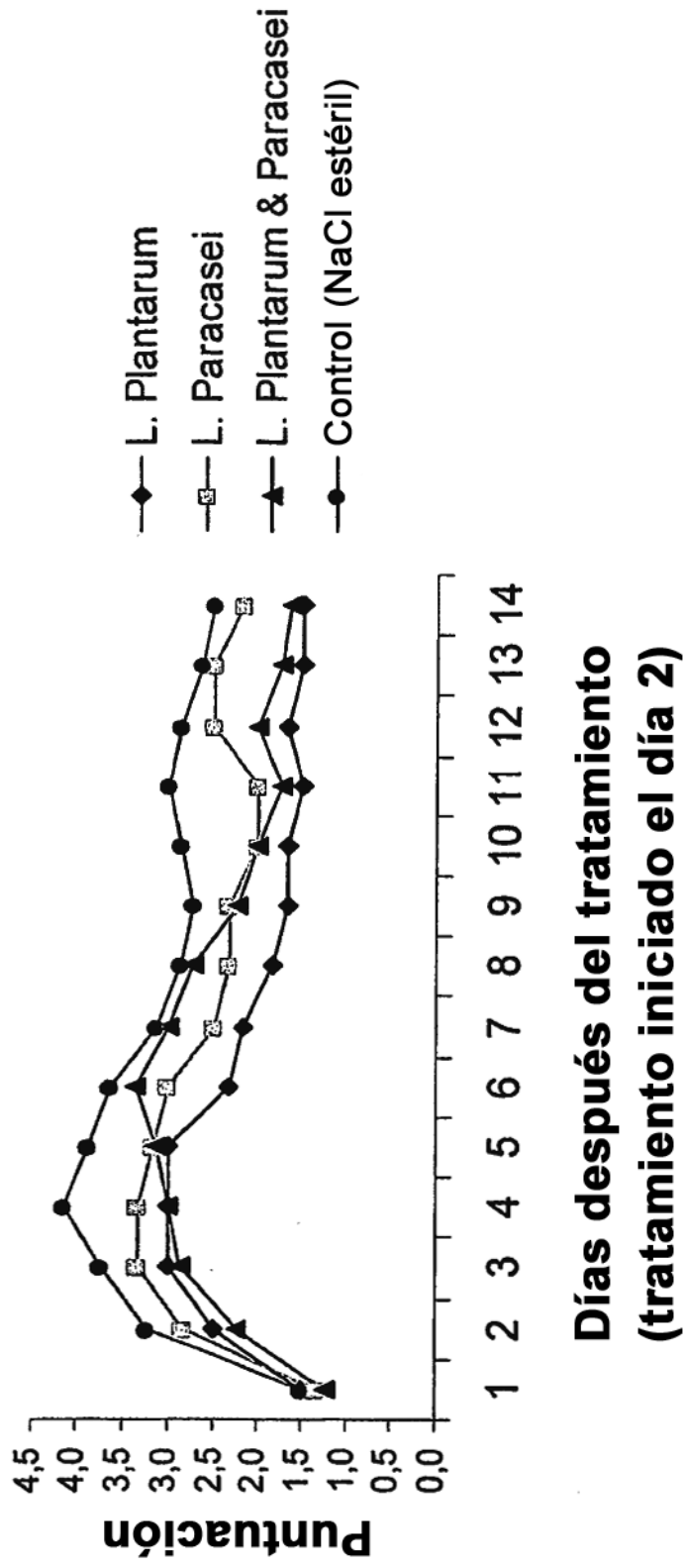


Fig. 11

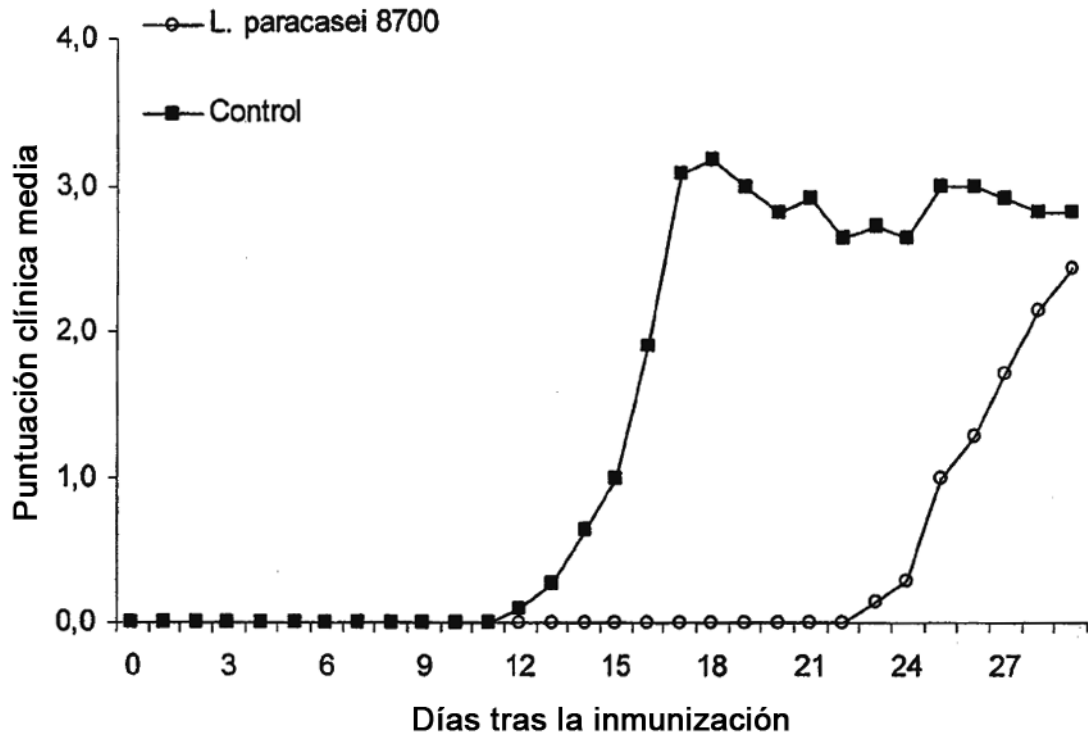


Fig. 12

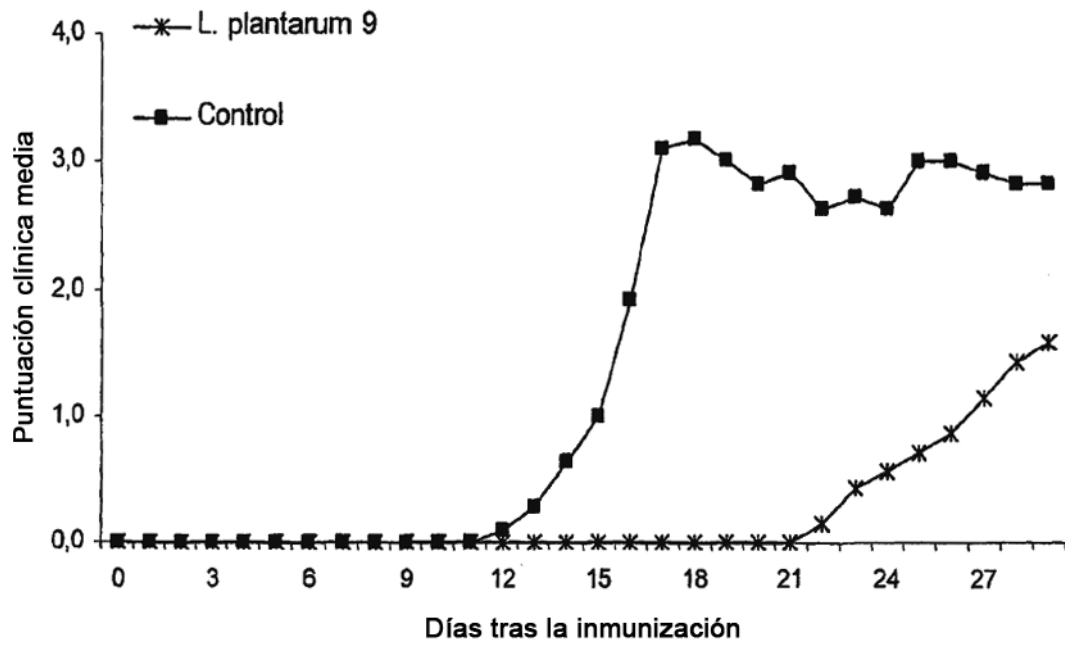




Fig. 13

**Transferencia de GLM + EAE  
(ganglios linfáticos mesentéricos)**

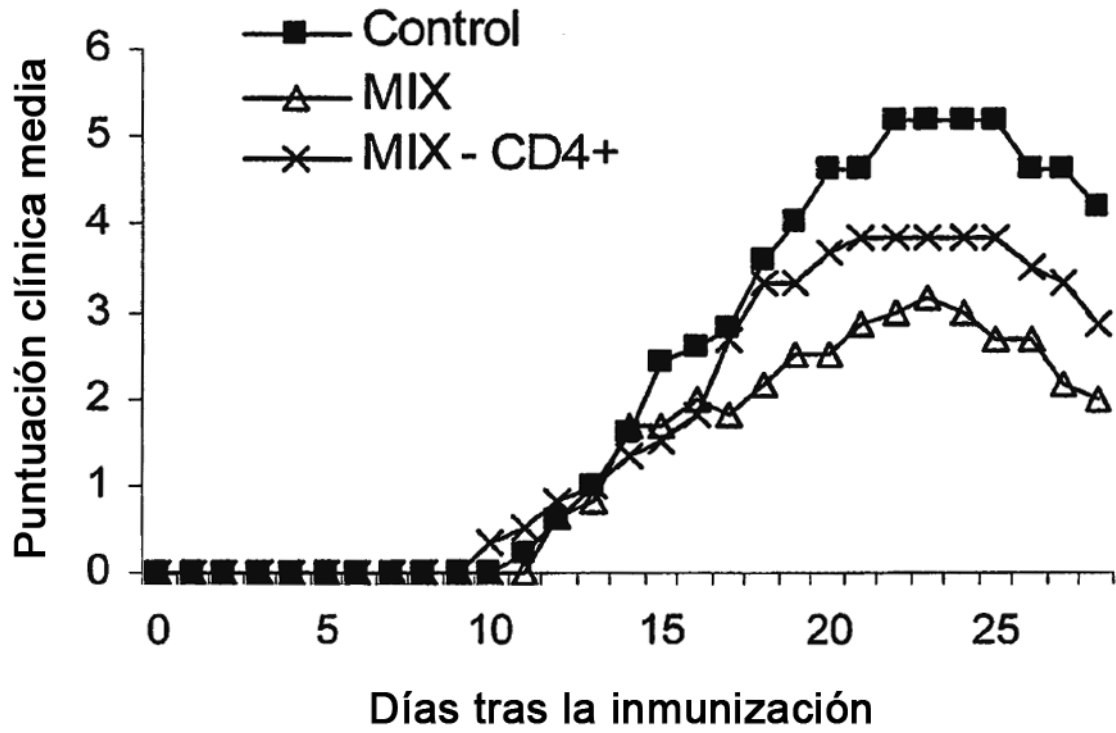
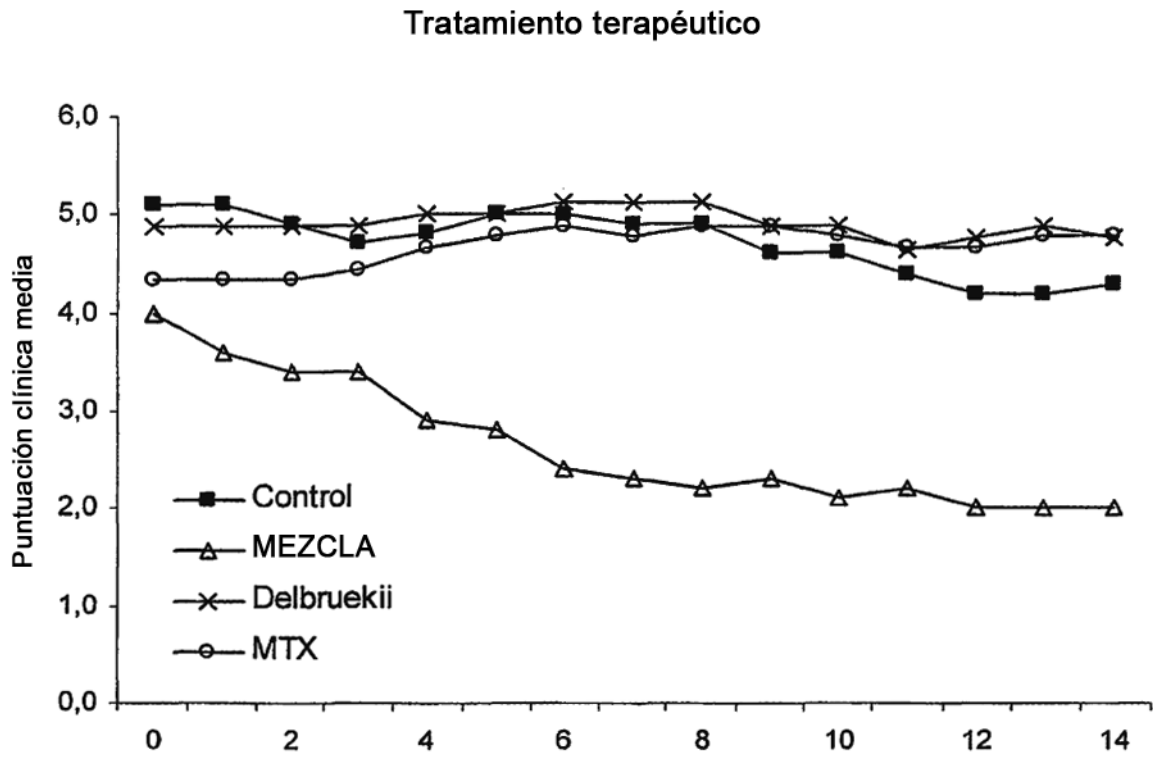


Fig. 14



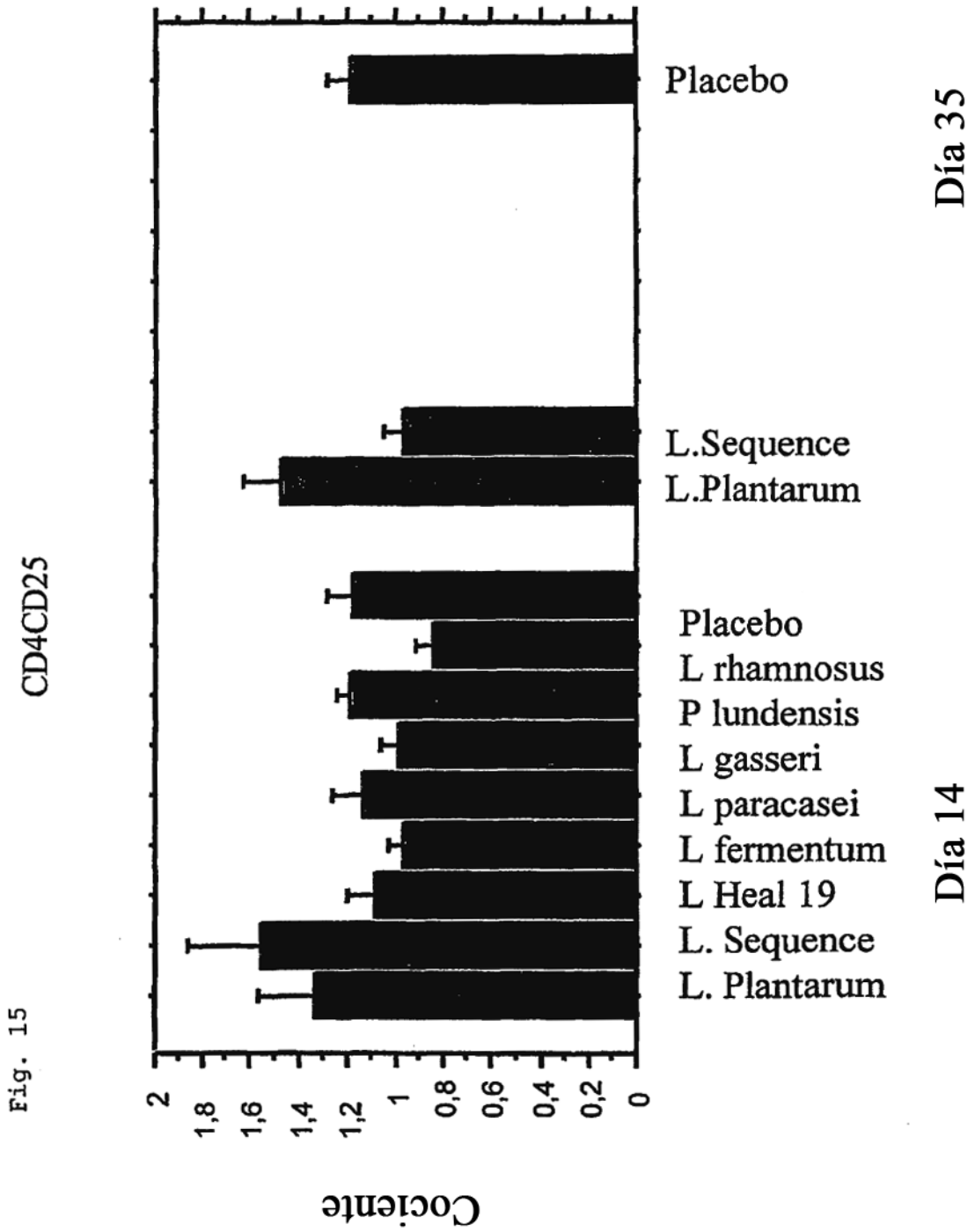


Fig. 16

