

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 963**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A23L 1/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2006 E 06795178 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 1915058**

54 Título: **Uso de lactobacterias específicas para la preparación de composiciones inmunomoduladoras**

30 Prioridad:

02.08.2005 IT MI20051510

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

13.08.2015

73 Titular/es:

**PROGE FARM S.R.L. (100.0%)
LARGO DONEGANI, 4/A
28100 NOVARA, IT**

72 Inventor/es:

**DONDI, GIANCARLA y
MALFA, PATRIZIA**

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 542 963 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 lactobacterias específicas para la preparación de composiciones inmunomoduladoras.

Campo de la invención

- 5 La presente invención versa sobre el uso de algunas lactobacterias particulares para la preparación de composiciones para el tratamiento de alergias e inmunodeficiencias; más específicamente, la invención versa sobre el uso de las dos cepas siguientes: *Lactobacillus salivarius* | 1794 y *Lactobacillus paracasei* | 1688, solas o mezcladas entre sí.

Antecedentes técnicos

- 10 Se ha descrito la influencia de ciertas bacterias que producen ácido láctico (BAL), presentes principalmente en alimentos fermentados y preparados probióticos, en la inmunidad de animales y seres humanos. En particular, algunas BAL han demostrado ser capaces de interactuar con el sistema inmunitario, modificando el tipo y el grado de protección contra los patógenos y las degeneraciones tumorales; también se ha demostrado un aumento en la respuesta inmunitaria en el ámbito de las membranas mucosas (Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 2004; 17:127-134; Infection and Immunity, 2000; 68(2):752-59).

15 Descripción de la invención

- También es sabido que no todas las lactobacterias son probióticas y que solo algunas tienen un efecto en el sistema inmunitario. Los estudios inmunológicos *in vitro* realizados con diversas cepas de BAL han proporcionado resultados contradictorios y en algunos sentidos antitéticos, demostrando que no solo la existencia de una actividad de las BAL en el sistema inmunitario es imprevisible, sino también que algunas cepas son capaces de inhibir la actividad de otras especies del mismo género (J. Immunol., 2002, 168:171-178).

- 20 Ahora se ha descubierto que dos cepas específicas de lactobacterias tienen un intenso efecto inmunomodulador, solas o combinadas, y que, por lo tanto, son útiles para el tratamiento de patologías asociadas con alteraciones del sistema inmunitario.

- 25 En particular, se ha hallado con sorpresa que dos cepas de lactobacterias, *Lactobacillus salivarius* | 1794 y *Lactobacillus paracasei* | 1688, tienen un efecto directo en el sistema inmunitario, estimulando las respuestas especialmente por parte de los linfocitos, los reguladores T y las células asesinas naturales, que producen un efecto beneficioso en sujetos con predisposición a las patologías del sistema inmunitario, en particular, pero no únicamente, en sujetos alérgicos y/o inmunodeficientes.

- 30 Así, según una de sus realizaciones, la invención versa sobre el uso de al menos una lactobacteria elegida entre *Lactobacillus salivarius* | 1794, *Lactobacillus paracasei* | 1688 y una mezcla de las mismas, para la preparación de una composición adecuada para el tratamiento de alergias e inmunodeficiencias.

El *Lactobacillus paracasei* | 1688 y el *Lactobacillus salivarius* | 1794 fueron descritos por vez primera en la patente europea nº 0861905, otorgada el 24.11.2004, a nombre del mismo solicitante, para el tratamiento de trastornos del aparato intestinal.

- 35 Según la presente invención, "mezcla" indica una asociación de las dos cepas de lactobacterias mencionadas en lo que antecede, en cualquier proporción relativa.

Según una realización preferente, la mezcla de la invención comprende las dos lactobacterias especificadas más arriba en una proporción de aproximadamente 10:1, más preferiblemente en las proporciones respectivas siguientes: 92% de *Lactobacillus paracasei* | 1688 y 8% de *Lactobacillus salivarius* | 1794.

- 40 La mezcla que comprende un 92% de *Lactobacillus paracasei* | 1688 y un 8% de *Lactobacillus salivarius* | 1794 es conocida *per se* para el tratamiento de trastornos del tracto gastrointestinal tales como el dismicrobismo, y es denominada común y comercialmente "PS MIX" (solicitud de marca).

También pueden usarse según la invención otras mezclas que comprendan cantidades relativas diferentes de las dos lactobacterias, si es necesario combinadas con otras lactobacterias o con agentes activos apropiados.

- 45 El *Lactobacillus salivarius* | 1794, el *Lactobacillus paracasei* | 1688 y sus mezclas definidas más arriba, definidos también en lo sucesivo en la presente memoria como "ingredientes activos", son particularmente útiles como medicamentos en la prevención y el tratamiento de patologías asociadas con la alergia e inmunodeficiencias.

- 50 De hecho, se ha demostrado que dichos ingredientes activos son activos en la estimulación de diferentes tipos de células inmunitarias, más específicamente en patologías que implican una respuesta de los linfocitos, especialmente linfocitos T colaboradores y T citotóxicos con CD25, células asesinas naturales, linfocitos B, células dendríticas y citoquinas, incluyendo, por ejemplo, TNF α , IFN γ , IL-10 e IL-12.

Los detalles de los ensayos realizados y de los sorprendentes resultados obtenidos con los ingredientes activos de la invención están dados en la sección experimental de la presente descripción.

Por lo tanto, el *Lactobacillus salivarius* I 1794, el *Lactobacillus paracasei* I 1688 y sus mezclas pueden ser usados, por ejemplo, en el tratamiento y la prevención de alergias y las patologías resultantes.

5 El *Lactobacillus salivarius* I 1794, el *Lactobacillus paracasei* I 1688 y sus mezclas también pueden usarse en el tratamiento y la prevención de inmunodeficiencias de cualquier origen y en las patologías resultantes.

10 Así, las composiciones de la invención pueden ser usadas, ventajosamente en forma oral, para el tratamiento de infecciones bacterianas o virales, tales como infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones de las membranas mucosas, infecciones de la piel y todas las infecciones derivadas de estados de inmunodeficiencia.

En un estado de inmunodeficiencia, las defensas del organismo contra los patógenos se reducen con la consiguiente alteración del equilibrio Th1/Th2, como, por ejemplo, en inmunodeficiencias fisiológicas (bebés recién nacidos, embarazo), inmunodeficiencias congénitas (enfermedades genéticas) e inmunodeficiencias adquiridas (SIDA, enfermedades autoinmunes).

15 Las composiciones de la invención también pueden ser útiles para apoyar las defensas inmunitarias naturales del organismo, por ejemplo en estados de estrés particulares tales como el estrés psicofísico que, si es excesivamente intenso o prolongado, puede llevar a una situación de inmunodeficiencia, manifestada clínicamente por formas infecciosas de intensidad variable.

20 Para realizar su acción, los ingredientes activos de la invención, es decir, el *Lactobacillus salivarius* I 1794, el *Lactobacillus paracasei* I 1688 y sus mezclas, son administrados preferentemente de manera sistémica, ventajosamente oralmente, en forma de composiciones, combinados posible pero no necesariamente con uno o más excipientes o vehículos fisiológica y/o farmacéuticamente aceptables.

25 Según la presente invención, el término "composiciones" indica cualquier composición, ya sea farmacéutica, dietética, alimentaria o nutracéutica, ventajosamente oral, que comprenda las lactobacterias descritas más arriba o mezclas de las mismas.

Dichas composiciones se preparan según la técnica conocida, teniendo en cuenta la particular naturaleza de los ingredientes activos de la invención, que consisten en material vivo, es decir, lactobacterias, que, por lo tanto, deben ser tratados de forma que sean capaces de sobrevivir a su tratamiento, su almacenamiento y su administración.

30 Según una realización preferente, las composiciones para su uso según la invención se encuentran en forma de unidades de dosificación para su administración una o varias veces al día, según el tipo y la gravedad de la patología que haya de tratarse y de la edad y el peso del paciente. En general, dichas unidades de dosificación contienen entre 10^3 y 10^{12} , ventajosamente entre 10^5 y 10^{10} , por ejemplo entre 10^8 y 10^{10} UFC (unidades formadoras de colonias) de los ingredientes activos por gramo de composición.

Para un tratamiento adecuado, generalmente se administran por día, por ejemplo, de 1 a 3 unidades de dosificación.

35 Preferentemente, los ingredientes activos para su uso según la invención son administrados de forma oral y se encuentran en forma liofilizada, incluidos en composiciones adecuadas posible pero no necesariamente con excipientes y estabilizantes convencionales, según los procedimientos bien conocidos para una persona experta en la técnica.

40 Así, para su uso según la invención, las composiciones que contienen los ingredientes activos son administradas durante un periodo de tiempo aproximado —si es necesario establecido por el especialista responsable—, que varía en general entre 1 semana y 1 mes o incluso más. Pueden tomarse en consideración tratamientos más cortos o más largos, también teniendo en cuenta la falta de toxicidad de los ingredientes activos, lo que permite el uso de los mismos incluso en exceso sin efectos secundarios peligrosos para la salud del sujeto tratado.

45 Las composiciones farmacéuticas, dietéticas, alimentarias y nutracéuticas según la invención incluyen cualquier medicamento, alimento, producto dietético o nutracéutico capaz de proporcionar en el organismo un vehículo para las lactobacterias descritas más arriba. Con fines puramente ilustrativos, estos incluyen, por ejemplo, fármacos; productos dietéticos; productos derivados de la leche, tales como yogur, queso, nata; productos de confitería; zumos de fruta; etc. Dichas composiciones pueden comprender otras sustancias beneficiosas para el organismo, tales como, por ejemplo, vitaminas, sales minerales y/u otros ingredientes activos compatibles, por ejemplo agentes prebióticos tales como inulinas, fosfo-oligosacáridos (FOS), fibras, etc.

50 Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitarla en modo alguno.

Ejemplo 1

Evaluación de la actividad directa de una mezcla de *Lactobacillus salivarius* I 1794 y *Lactobacillus paracasei* I 1688 sobre las células del sistema inmunitario sistémico

5 Se evaluó la respuesta proliferativa de los linfocitos de la sangre periférica de algunos sujetos como una respuesta a las siguientes dosis de *Lactobacillus salivarius* I 1794 y *Lactobacillus paracasei* I 1688 y a dos mezclas de los mismos.

Antes de proseguir con las diferentes evaluaciones descritas a continuación, las bacterias fueron sometidas a irradiación gamma durante 24 horas con una fuente de cesio para bloquear toda proliferación espontánea de las mismas.

10 Los linfocitos de 15 sujetos sanos, aislados mediante centrifugación por gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, Oslo, Noruega), resuspendidos en un medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escocia), fueron puestos, con la adición de 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina (Gibco) y suero fetal bovino al 10% (SFB, Euroclone-Celbio, Milán, Italia) (RPMI-SFB), en un cultivo ($1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$), por triplicado, en microplacas con 96 pocillos con fondo en U (cultivos no estimulados) o (cultivos estimulados) con *Lactobacillus salivarius* (I 1794) ($1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$), *Lactobacillus paracasei* (I 1688) ($1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$), PS MIX (solicitud de marca) ($1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$), o *Candida albicans* ($2 \times 10^5/200 \mu\text{l}$) como control positivo, a 37°C en una atmósfera humidificada, con un 5% de CO₂. Dieciocho horas después de la recogida, se añadió a cada pocillo 1µCi de [³H]TdR (Amersham Pharmacia Biotech, Milán, Italia).

Para los ensayos de proliferación se usaron las proporciones siguientes entre bacterias/linfocitos de la sangre periférica:

20 bacterias: linfocitos

200:1

100:1

25

20:1

10:1

30

5:1

1:1

35

0,5:1

0,1:1

0,01:1

40

0,005:1

0,001:1

45 comparadas con la respuesta proliferativa de *Candida albicans* a dos proporciones (0,2:1 y 2:1) en un cultivo celular de seis días, a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

Los resultados fueron expresados como índice de simulación (IS: cpm de cultivos estimulados/cpm de cultivos no estimulados, significando cpm "cuentas por minuto") e indican la medición del reconocimiento de los antígenos bacterianos por parte de los linfocitos y su capacidad de respuesta, proliferando, al reconocimiento de los antígenos.

Resultados

50 Se observó una respuesta proliferativa excelente al cocultivo de bacterias/células, denotando el reconocimiento por parte de los linfocitos de los determinantes antigénicos de las lactobacterias y la activación de los linfocitos tras dicho reconocimiento.

Ejemplo 2

Fenotipo de las subpoblaciones linfocíticas

El fenotipo de las subpoblaciones linfocíticas fue evaluado en el instante 0, antes del cultivo de las bacterias, y después de un cultivo de 6 días para evaluar qué fenotipo se indujo.

- 5 Se usaron anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-HLA para evaluar las poblaciones y subpoblaciones linfocíticas T, anti-CD16 y anti-CD56 para evaluar las células asesinas naturales, anti-CD20, anti-CD38 y anti-CD79 para las poblaciones linfocíticas B y las células plasmáticas. La lectura se llevó a cabo con un procedimiento tricolor.

Resultados

Se observó un aumento sustancial en las células asesinas naturales, las cuales, como es sabido, proporcionan una mejor respuesta a las células infectadas por virus y a las células transformadas neoplásicamente.

- 10 También se observó un aumento en los linfocitos T colaboradores y los linfocitos T citotóxicos con membrana CD25, que representan las subpoblaciones más directamente afectadas por una modulación de la respuesta inmunitaria.

Ejemplo 3

Se estableció la producción de algunas citoquinas en la capa leucocitaria de los cultivos celulares mediante un procedimiento ELISA desarrollado para cada citoquina (TNF-alfa, IFN-gamma, IL-10, IL-12, IL-4).

- 15 Resultados

La producción de IL-4 en el sobrenadante en respuesta a la activación de los linfocitos por las lactobacterias estuvo por debajo de los niveles medibles con el ensayo ELISA, indicando la falta de activación de los colaboradores T 2 (Th2), responsables de la inducción de los fenómenos alérgicos.

- 20 Por otro lado, se hallaron valores elevados de TNF-alfa e IFN-gamma, indicando la activación de los colaboradores T 1 (Th1).

También se hallaron cantidades considerables de IL-10 e IL-12; como es sabido, el primero induce la diferenciación de los linfocitos B, inhibe la activación de los macrófagos y protege contra el riesgo de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), y el segundo activa las células asesinas naturales induciendo la producción de IFN-gamma, agente crucial en las primeras fases de una infección.

- 25 Ejemplo 4

Se prepara una composición oral, en forma de polvo, que comprende los siguientes componentes para cada unidad de dosificación:

PS MIX (solicitud de marca) (liofilizada) 1×10^8 - 1×10^{10}

- 30 Sacarosa; maltodextrinas; aroma; sílice; vitamina B2; vitamina B1.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de *Lactobacillus salivarius* I 1794 y *Lactobacillus paracasei* I 1688 para su uso en la prevención y el tratamiento de alergias y en la prevención y el tratamiento de inmunodeficiencias.
- 5 2. La mezcla para su uso según se reivindica en la reivindicación 1 caracterizada por usarse en cualquier proporción.
3. La mezcla para su uso según se reivindica en la reivindicación 2 caracterizada por comprender un 8% de *Lactobacillus salivarius* I 1794 y un 92% de *Lactobacillus paracasei* I 1688.
4. La mezcla para su uso según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 3 en la que dicha mezcla es combinada con otras lactobacterias u otros agentes activos.
- 10 5. La mezcla para su uso según se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizada por ser administrada en forma de composiciones orales, si es necesario con uno o más excipientes y/o vehículos fisiológica y/o farmacéuticamente aceptables.
6. La mezcla para su uso según se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizada por ser administrada en la cantidad de al menos 1×10^8 - 1×10^{10} UFC por día.
- 15 7. La mezcla para su uso según se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizada por ser administrada tras la reconstitución de la forma liofilizada.
8. La mezcla para su uso según se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizada por ser administrada en forma de unidades de dosificación.
- 20 9. Una composición farmacéutica, dietética, alimentaria o nutracéutica que comprende una mezcla definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en la prevención y el tratamiento de alergias y en la prevención y el tratamiento de inmunodeficiencias.
10. La composición para su uso según la reivindicación 9 que es para su administración oral.
11. La composición para su uso según las reivindicaciones 9 o 10 en forma de unidades de dosificación que comprenden entre 10^3 y 10^{12} UFC de dicha mezcla.
- 25 12. La composición para su uso según la reivindicación 11 en forma de unidades de dosificación que comprenden entre 10^8 y 10^{10} UFC de dicha mezcla.