

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 803**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2011 E 11717732 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2544698**

54 Título: **Composición que comprende bacterias probióticas para su uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios**

30 Prioridad:

08.03.2010 IT MI20100375

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

07.09.2016

73 Titular/es:

**PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)
Via E. Mattei 3
28100 Novara, IT**

72 Inventor/es:

**MOGNA, GIOVANNI;
STROZZI, GIAN PAOLO;
DRAGO, LORENZO y
MOGNA, LUCA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 581 803 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 bacterias probióticas para su uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende bacterias probióticas como se define en las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de patologías asociadas con alteraciones del sistema inmunitario. En particular, la presente invención como se reivindica se refiere a el uso de bacterias probióticas seleccionadas para la preparación de una composición para su uso en el tratamiento de alergias, tales como dermatitis atópica.

10 Es bien conocido que la dermatitis atópica (de aquí en adelante DA por razones de brevedad) es un trastorno crónico de la piel con recaídas que comienza en el periodo neonatal o en la infancia y puede continuar en la edad adulta. Por lo tanto, las fases de la DA se dividen en neonatal, infantil y adulta. La DA es una enfermedad inflamatoria de la piel que, como el asma y la rinitis alérgica, se asocia con la infiltración local de linfocitos T que producen interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5).

15 La IL-4, como es bien conocido, regula el desarrollo del fenotipo T auxiliar 2 (Th2), con la consiguiente hiperproducción de inmunoglobulina (Ig) y eosinofilia. Los niveles elevados en suero de Ig E y los ensayos positivos en la piel para los alérgenos alimentarios e inhalados pueden demostrarse en el 80-90 % de los sujetos con dermatitis atópica.

20 La DA se basa tanto en factores genéticos como en factores inmunológicos, a pesar de que un gran número de factores externos pueden modificar su expresión. En el 60 % de los casos de DA pueden demostrarse antecedentes familiares de atopía; en otras palabras, si un progenitor tiene una diátesis atópica existe una probabilidad del 60 % de que el descendiente sea atópico.

La atopía es la predisposición genética para el desarrollo de reacciones anafilácticas localizadas después del contacto, ingestión, inoculación o inhalación de alérgenos.

30 Los factores inmunológicos que se tienen en cuenta en la etiología de la DA son: alergia alimentaria, alergia inducida por contacto con alérgenos e irritantes, alergia inducida por aeroalérgenos y anomalías inmunorreguladoras.

35 Entre la multitud de tratamientos dirigidos para la cura y/o prevención de alergias o inflamaciones de la piel, en particular, para el tratamiento de la dermatitis atópica, destacan muchos tratamientos basados en fármacos.

Los tratamientos basados en fármacos tienen varias contraindicaciones que limitan su uso. Además, estos fármacos no parecen tolerarse bien por algunos tipos de pacientes.

40 Sin embargo, actualmente no existe un tratamiento que tenga una eficacia absoluta y definitiva. Solo es posible adoptar ciertas precauciones frente a la aparición de alergias o, según sea necesario, remedios para mitigar los síntomas molestos, tales como el prurito y el enrojecimiento de la piel.

45 Por lo tanto, persiste una necesidad de tener un tratamiento que no presente las limitaciones de los tratamientos basados en fármacos y que pueda administrarse a todo tipo de pacientes.

En particular, persiste una necesidad de tener un tratamiento que pueda servir para combatir la aparición de alergias y el desarrollo de inflamaciones de la piel y/o reducir los síntomas molestos tales como enrojecimiento del tejido de la piel, prurito y eczema.

50 El solicitante ha proporcionado una respuesta a las necesidades mencionadas anteriormente ya que ha tenido éxito, tras una actividad de investigación intensa, en la selección de cepas bacterianas probióticas específicas.

La materia objeto de la presente invención es una composición como se define en las reivindicaciones 1-11.

55 En el presente documento se describe el uso de al menos un cultivo de bacterias probióticas.

El solicitante se ha fijado el objetivo de seleccionar cepas bacterianas específicas con el fin de evaluar su efecto en el curso clínico y la calidad de vida de los pacientes con DA moderada o grave y con el fin de determinar su influencia en los parámetros clínicos e inmunológicos.

60 Además, el solicitante se fijó el objetivo de seleccionar cepas bacterianas con actividad probiótica capaces de ser toleradas por pacientes y aptas para la colonización del aparato intestinal.

65 El diagnóstico de la DA moderada/grave se ha evaluado usando un índice estandarizado de gravedad para la dermatitis atópica –de aquí en adelante indicada como DA– (índice SCORAD = puntuación de dermatitis atópica). Dicho índice es conocido por los expertos en la materia.

Se ha encontrado que las cepas bacterianas de la presente invención tienen un alto efecto inmunomodulador y de este modo son útiles para el tratamiento de patologías asociadas con alteraciones del sistema inmunitario.

Después de una actividad intensa de investigación, el solicitante ha seleccionado, de entre muchas cepas ensayadas, las siguientes cepas bacterianas probióticas:

- 1) *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, depositada el 23.07.2009, por la compañía Probiotical SpA de Novara – Italia;
- 2) *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604, depositada el 20.07.2004, por la compañía Probiotical SpA de Novara – Italia;
- 3) *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980, depositada el 14.11.2008, por la compañía Probiotical SpA de Novara – Italia;
- 4) *Streptococcus thermophilus* (FP4) DSM 18616, depositada el 13.09.2006, por la compañía Mofin Srl de Novara – Italia;
- 5) *Lactobacillus casei* ssp. *ramnosus* (LR04) DSM 16605, depositada el 20.07.2004, por la compañía Probiotical SpA de Novara – Italia; y
- 6) *Lactobacillus acidophilus* (LA02) DSM 21717, depositada el 06.08.2008, por la compañía Probiotical SpA de Novara – Italia.

Todos los cultivos indicados anteriormente se han depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ) en Alemania, de acuerdo con el Tratado de Budapest.

En el contexto de la presente invención, los cultivos de bacterias probióticas pueden estar en forma de bacterias vivas, bacterias muertas o componentes celulares, extractos celulares o sus lisados.

En el presente documento se describe una composición que comprende al menos un cultivo bacteriano para su uso como una composición inmunomoduladora con capacidad para modular el sistema inmunitario.

La expresión “composición inmunomoduladora” significa que la composición tiene la capacidad de modular el sistema inmunitario en el sentido de que tiene la capacidad de estimular/inducir varias respuestas del sistema inmunitario, volviéndolo más reactivo, por ejemplo, interviniendo a través de la producción de citoquinas específicas.

De manera ventajosa, dicha composición inmunomoduladora induce al sistema inmunitario hacia la producción de citoquinas tipo 1.

De manera ventajosa, las cepas bacterianas y los correspondientes cultivos bacterianos han demostrado tener la capacidad de mejorar los parámetros clínicos e inmunológicos. En particular, se ha observado que tiene la capacidad de:

- 1) mejorar significativamente el índice SCORAD y el DLQI;
- 2) reducir la translocación microbiana (niveles de LPS en plasma) y activar los linfocitos T CD8+;
- 3) aumentar el porcentaje tanto de los linfocitos T reguladores (Treg) totales, como de los mismos que expresan los marcadores TLR2 y TLR4;
- 4) mejorar las relaciones Th1/Th2 y Th17/Treg.

Por lo tanto, la composición de la presente invención (composición inmunomoduladora) tiene la capacidad de prevenir, reducir y/o curar las patologías asociadas con alteraciones del sistema inmunitario, tales como alergias, atopía, rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis atópica, eczema, asma e inmunodeficiencias.

La presente invención se refiere a una composición que comprende o consiste en *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 y *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980.

En una realización preferida, la composición comprende o, alternativamente, consiste en los cultivos de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604.

En el presente documento se describe una composición que comprende o, alternativamente, consiste en dicho cultivo de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y de dicho cultivo de *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 junto con al menos otro cultivo de *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980.

En una realización preferida, la composición comprende o, alternativamente, consiste en los cultivos de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 y *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980.

De acuerdo con otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de al menos un cultivo de bacterias probióticas seleccionado del grupo que comprende o, alternativamente, consiste en los cultivos de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 y *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM

21980, para la preparación de una composición que tiene la capacidad de prevenir, reducir y/o curar las patologías asociadas con alteraciones del sistema inmunitario tales como alergias, atopía, rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis atópica, eczema, asma e inmunodeficiencias.

5 De acuerdo con otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende o, alternativamente, consiste en dichos cultivos de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604.

10 Preferentemente, la invención se refiere al uso de dicho cultivo de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y de dicho cultivo de *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 junto con al menos otro cultivo seleccionado del grupo que comprende: *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980 para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de la dermatitis atópica.

15 De acuerdo con otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende o, alternativamente, consiste en *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, *Bifidobacterium breve* (BR03) y *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980.

20 De manera ventajosa, la composición comprende o, alternativamente, consiste en *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 en una relación en peso que comprende de 1:3 a 3:1, preferentemente 1:1.

25 Alternativamente, la composición comprende o, alternativamente, consiste en *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 y *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980, preferentemente en una relación en peso de 1:1:1.

Los cultivos bacterianos de la presente invención pueden considerarse como "ingredientes activos" que pueden mezclarse, en las proporciones debidas, con excipientes fisiológica y/o farmacéuticamente aceptables.

30 Para aumentar su actividad, los ingredientes activos pueden administrarse sistemáticamente, de manera ventajosa vía oral, en forma de composiciones en estado sólido, preparadas de acuerdo con las técnicas conocidas por los expertos en la materia.

35 En una realización preferida, las composiciones están en forma de liofilizados, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas de gelatina blanda o suspensiones.

Las composiciones de la presente invención pueden ser composiciones farmacéuticas, dietéticas, nutricionales o nutracéuticas.

40 Las composiciones de la presente invención además pueden comprender fibras dietéticas con actividad prebiótica, tales como fructooligosacaridos (FOS), inulina y goma guar parcialmente hidrolizada (PHGG).

45 Las composiciones farmacéuticas, dietéticas, nutricionales o nutracéuticas de la presente invención comprenden al menos un cultivo de bacterias probióticas, como se ha indicado anteriormente. La concentración final de la composición que comprende de 1×10^7 a 1×10^{10} UFC/g de composición, preferentemente de 1×10^8 a 1×10^{10} UFC/g de composición.

Las composiciones de la presente invención, que comprenden bacterias probióticas seleccionadas, son útiles como composiciones inmunomoduladoras capaces de modular el sistema inmunitario.

50 Dichas composiciones son capaces de curar y/o prevenir las patologías asociadas con alteraciones en las funciones de las siguientes citoquinas: Th1 (IFN- γ e IL-12) y Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) como se reivindica.

55 Además, dichas composiciones son capaces de inducir el sistema inmunitario, induciendo a este último hacia la producción de citoquinas tipo 1.

60 Por lo tanto, las composiciones de la presente invención tienen una aplicación válida para el tratamiento preventivo y/o curativo de patologías asociadas con alteraciones del sistema inmunitario, en particular para el tratamiento preventivo y/o curativo de alergias, atopía, rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis atópica, eczema, asma o inmunodeficiencias.

De manera ventajosa, las composiciones de la presente invención tienen una aplicación válida en el tratamiento preventivo y/o curativo de la dermatitis atópica.

65 De manera ventajosa, la ingesta, por pacientes afectados con dermatitis atópica DA, de una composición probiótica que comprende el cultivo de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y el cultivo de *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 a una concentración que comprende de 1×10^7 a 1×10^{11} UFC, preferentemente 1×10^9 UFC/g, determina

un descenso en el índice Scorad (un valor Scorad más bajo indica una mejor calidad de vida).

Además, la administración de dicha composición probiótica durante un periodo que comprende de 12 a 24 semanas, preferentemente 16 semanas, puede reducir/bloquear la secreción de la citoquina IL-4.

5

Parte experimental (I)

El solicitante ensayó la totalidad de las seis cepas mencionadas anteriormente.

10 Se llevó a cabo un primer estudio clínico para ensayar una composición que comprendía el cultivo de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y el cultivo de *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604.

Un grupo de 40 pacientes (hombres y mujeres, de edades de 18 a 55 años) con DA moderada/grave se distribuyeron al azar (1:1) en dos grupos.

15

El diagnóstico de DA moderada/grave, se evaluó usando un índice de gravedad de DA estandarizado (índice SCORAD = puntuación de dermatitis atópica). Dicho índice es conocido por los expertos en la materia.

20 T0 representa el tiempo cero, como el punto de comienzo del tratamiento, mientras que T16 representa la semana 16 del periodo de tratamiento. En el T16 se llevó a cabo un examen, con Scorad y muestreo.

25 El grupo A se trató con una composición que comprendía el cultivo de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y el cultivo de *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604, que tenían una concentración de 1×10^9 UFC (que corresponde a 0,01 g). Los dos cultivos se mezclaron con 1 g de almidón de maíz para proporcionar una composición final de 1,01 g en sobres. Los 20 pacientes del grupo A recibieron 2 sobres por día durante 16 semanas.

El grupo B se trató con un placebo representado por 1 g de (solo) almidón de maíz. Los 20 pacientes del grupo B recibieron 2 sobres de placebo por día durante 16 semanas.

30

Se ensayaron las siguientes citoquinas: Th1 (IFN- γ e IL-12) y Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10).

Todos los datos de los 40 pacientes se recogieron y analizaron minuciosamente.

35 La figura 1 muestra un histograma relativo al índice Scorad en T0 y T16.

40 Los resultados obtenidos muestran que la ingesta, por los 20 pacientes del grupo A, de la composición probiótica que comprendía el cultivo de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y el cultivo de *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604, a una concentración de 1×10^9 UFC, determinó una disminución en el Scorad en pacientes afectados por DA (un valor más bajo de Scorad indica una mejor calidad de vida).

45 Además, la administración de dicha composición probiótica durante 16 semanas podía bloquear la secreción de la citoquina considerada, IL-4, cuyo valor medio era comparable con el obtenido en el momento de la inscripción. Mientras que, por el contrario, la administración del placebo no podía bloquear la liberación de la citoquina IL-4, que aumentó significativamente después de 16 semanas de tratamiento (evolución de la enfermedad).

Se llevaron a cabo una serie de estudios pre-clínicos *in vitro* en un grupo de bacterias que comprendía, entre otras, el cultivo de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y el cultivo de *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604.

50 Los estudios pre-clínicos *in vitro* comparando las capacidades inmunomoduladoras de las cepas bacterianas ensayadas demostraron que el cultivo de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y el cultivo de *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 muestran una capacidad superior en la inducción de la producción de citoquinas tipo 1.

55 También se ensayaron los cultivos de las bacterias *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980, *Streptococcus thermophilus* (FP4) DSM 18616, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (LR04) DSM 16605 y *Lactobacillus acidophilus* (LA02) DSM 21717.

El cultivo de la cepa *L. pentosus* (LPS01) DSM 21980 demostró *in vitro* inducir un perfil muy fuerte de citoquina pro-Th1.

60

Además, todos los cultivos de las cepas de *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980, *Streptococcus thermophilus* (FP4) DSM 18616, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (LR04) DSM 16605 y *Lactobacillus acidophilus* (LA02) DSM 21717 se ensayaron con respecto a su capacidad de inducir la síntesis de IL-12 mediante PBMC en un estudio *in vivo*. La IL-12 es una citoquina de tipo Th1 y representa un elemento clave en el tratamiento de alergias y otras patologías atópicas.

65

Como ejemplo, se informa de los datos relativos a *L. pentosus* (LPS01) DSM 21980, ensayados en PBMC: Th-1 (pg/ml) = 1,754; Th-2 (pg/ml) = 326; Th1/Th2 = 5,38.

Parte experimental (II)

5 El solicitante llevó a cabo un primer estudio clínico usando una composición que comprendía los cultivos de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y *Bifidobacterium breve* (BR03) y un segundo estudio clínico usando una composición que comprendía los cultivos de *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, *Bifidobacterium breve* (BR03) y *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980. Por razones de simplificación, solo se informa de los detalles de dicho primer estudio clínico, debido a que dicho segundo estudio clínico se llevó a cabo con los mismos procedimientos. Ambos estudios clínicos (primero y segundo) proporcionaron resultados comparables.

15 El solicitante llevó a cabo dicho primer estudio clínico (aleatorizado, con doble ocultación, en pacientes afectados por dermatitis atópica grave o moderada), para evaluar la eficacia clínica de la administración de dos cepas bacterianas probióticas, concretamente *Lactobacillus salivarius* (LS01), depositada en la DSMZ y que tiene el número de depósito DSM 22775, y *Bifidobacterium breve* (BR03), depositada en la DSMZ y que tiene el número de depósito DSM 16604.

Materiales y procedimientos

20 En el estudio participaron 48 pacientes afectados por dermatitis atópica (de aquí en adelante DA). Sus características se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	Pacientes con probióticos (n=31)	Pacientes con placebo (n=15)
Sexo (M/F)	14/17	5/10
Edad (años)	32,44 ± 1,47	30,91 ± 2,79
Alergia respiratoria	23/31 (74,2 %)	9/15 (60 %)
Alergia alimentaria	2/31 (6,4 %)	2/15 (13,3 %)
Otras alergias	7/31 (22,6 %)	2/15 (13,3 %)
No alergias	5/31 (16 %)	4/15 (26,6 %)
Años de DA	19,36 ± 2,38	15,08 ± 3,04

25 El presente estudio clínico se llevó a cabo en el periodo de abril-septiembre de 2010.

30 Treinta y dos (32) pacientes (grupo de tratamiento) recibieron una preparación que contenía las dos cepas bacterianas probióticas, concretamente *L. salivarius* (LS01) DSM 22775 y *B. breve* (BR03) DSM 16604, en una dosis de 1×10^9 UFC/g de cada cepa en maltodextrina.

35 Mientras tanto 16 pacientes (grupo placebo) recibieron una preparación de maltodextrina solamente. Ambos grupos se trataron dos veces al día durante 12 semanas. Las composiciones en forma liofilizada se disolvieron en agua y se administraron por vía oral a los pacientes.

40 Ninguno de los pacientes modificó su dieta y a todos se les pidió que no consumieran productos fermentados que contuvieran microorganismos vivos durante el estudio clínico. Los pacientes que estaban afectados por una enfermedad alérgica activa (respiratoria o de la piel), o una enfermedad infecciosa durante el embarazo o la lactancia, se excluyeron del presente estudio.

45 Los pacientes que habían recibido un tratamiento con probióticos, antibióticos o inmunomoduladores durante los seis meses antes de la inscripción o que habían recibido un tratamiento con esteroides por vía oral un mes antes de la inscripción, se excluyeron del presente estudio. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado en el momento de la inscripción.

50 La evaluación clínica se basó en el índice SCORAD (Puntuación de dermatitis atópica) y en el DLQI, (Índice de calidad de vida de dermatología) y en la translocación microbiana y parámetros inmunológicos. Para cada paciente individual, se hicieron todas las evaluaciones en el momento de la inscripción (línea de base), después de 3 meses de tratamiento (3 meses) y dos meses después del final de la terapia (3+2 meses).

Cuestionario de síntomas y calidad de vida

55 Los criterios diagnósticos para la DA se fijaron siguiendo la guía clínica publicada recientemente. La gravedad clínica se evaluó usando el índice SCORAD desarrollado por el European Task Force for atopic dermatitis. En el curso del estudio, para medir las variaciones en los síntomas unidos a la patología, todos los pacientes inscritos completaron el cuestionario específico DLQI (índice de calidad de vida de dermatología). La evaluación SCORAD se llevó a cabo

al inicio, al final y dos meses después de la suspensión del tratamiento (probióticos o placebo) por un operador que no sabía en qué grupo se escribió el paciente. El DLQI se completó por los pacientes en el momento de la inscripción y a las 12 y 20 semanas.

5 Separación del plasma y de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

10 Para la separación del plasma y de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se extrajeron las muestras de sangre venosa periférica de todos los sujetos de estudio en el momento de la inscripción, después de 3 meses de tratamiento y 2 meses tras la suspensión de la terapia. El plasma se almacenó hasta el momento del análisis, en el que las PBMC se separaron mediante centrifugación en gradiente de densidad. La viabilidad celular se determinó usando un contador de células Adam-MC.

Estimulación de las PBMC

15 Las PBMC se incubaron durante 18 horas en presencia o ausencia de estimulación con lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Se llevó a cabo un análisis de las citoquinas inducidas por el estímulo antigénico mediante citometría de flujo, añadiendo brefeldina A como inhibidor del transporte celular en las últimas horas del cultivo.

Análisis inmunofenotípico

20 Se calculó el porcentaje de linfocitos T CD8+ activados directamente en las muestras de sangre venosa periférica mediante análisis citofluorimétrico usando anticuerpos monoclonales (mAb) conjugados con fluorocromos (CD8, CD38, CD45RO). Tras la incubación con el mAb, los eritrocitos se lisaron y las células se fijaron y analizaron con un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter).

Análisis de subpoblaciones de linfocitos

30 La identificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T se llevó a cabo en cultivos de PBMC no estimuladas y cultivos de PBMC estimuladas durante 18 horas con LPS, en todo momento (línea de base, 3 meses y 3+2 meses). El marcado de las células se hizo usando simultáneamente combinaciones de anticuerpos fluorescentes capaces de reconocer moléculas tanto en la superficie celular como en los componentes intracelulares. Específicamente, se identificaron los linfocitos auxiliares T tipo 1, (Th1) como CD4+/IFN- γ +Tbet+; los linfocitos auxiliares T tipo 2 (Th2) como CD4+/IL-4+/GATA3+; los linfocitos axilares T tipo 17 (Th17) como CD4+/IL-17+/ROR γ T+ y, finalmente, los linfocitos auxiliares T reguladores (Treg) como CD4+/CD25+/FoxP3+/IL-10+/TGF- β +.

Evaluación de la expresión de los receptores tipo Toll (TLR) en los linfocitos T reguladores

40 El análisis se realizó en PBMC no estimuladas, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del mAb. Específicamente, se necesitaron los siguientes mAb: CD4, CD25, FoxP3, TLR-4, TLR-2.

Ensayo de LPS en plasma

45 Para determinar la concentración del LPS presente en las muestras de plasma, se hizo uso del kit "LAL Chromogenic Endpoint Assay" vendido por la compañía Hycult biotechnology, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos. Tras 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm con un espectrofotómetro y se calculó la concentración de LPS, expresada en pg/ml, por interpolación con una curva de concentración conocida.

Recogida y almacenamiento de muestras fecales

50 Las muestras fecales se recogieron en el momento de la inscripción, tras 3 meses de tratamiento y 2 meses después del final del estudio. Las muestras se pusieron inmediatamente a 4 °C, se tomaron partes alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta el momento del análisis.

55 Cuantificación de las bacterias presentes en las muestras fecales

60 La cuantificación se llevó a cabo en todas las bacterias aerobias y en los siguientes grupos bacterianos: Enterobacteria, Staphylococci, Lactobacilli (en particular *L. salivarius* LS01) y Bifidobacterias (en particular *B. breve* BR03). Las muestras fecales se diluyeron en soluciones fisiológicas y las diluciones apropiadas se incubaron de acuerdo con el siguiente esquema:

Todas las bacterias AEROBIAS: Agar de soja tríptico con sangre de oveja al 5 % (AS);
 Enterobacteria: Agar MacConkey (MC);
 Staphylococci: Agar Manitol Sal (MSA);
 Lactobacilli: Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS);
 Bifidobacteria: Medio selectivo para Bifidobacterium (BSM).

Los medios MC y BSM se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 horas, respectivamente. Los medios AS, MRS y BSM se incubaron a 37 °C, en presencia de dióxido de carbono al 10 %, durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente.

5 Todas las colonias se identificaron a través del crecimiento en los medios selectivos, tinción Gram, morfología celular y ensayos de la catalasa y oxidasa.

10 La composición de la microbiota intestinal se expresó como el recuento (media ± desviación estándar del logaritmo en base 10 (log 10) por gramo de heces) para cada grupo bacteriano. Los límites de detección eran 2 log₁₀ UFC/g para todos los microorganismos con la excepción de *B. breve*, cuyo límite era 5 log₁₀ UFC/g. Las modificaciones de los recuentos de los diferentes grupos microbianos se calcularon como:

$$[(\text{Log}_{10} \text{ UFC/g en T12 o T16}) - (\text{Log}_{10} \text{ UFC/g en T0})]$$

15 Identificación molecular de *L. salivarius* LS01 y de *B. breve* BR03

Las dos cepas bacterianas se identificaron inicialmente en base a sus peculiaridades morfológicas: *L. salivarius* LS01 cultivada en medio BSM agarizado forma colonias coloreadas en blanco-crema, redondeadas con una forma alargada y un diámetro que comprendía de 2 a 4 mm; *B. breve* BR03 en medio BSM agarizado forma colonias coloreadas fucsia, redondeadas con una forma alargada y un diámetro que comprendía de 1 a 2 mm.

20 En los cultivos en los que era posible asumir la presidencia de las cepas de *L. salivarius* y *B. breve*, se analizaron 10 colonias al azar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con las guías publicadas por el National Institute of Health. Todas las colonias clasificadas como *L. salivarius* o *B. breve* se caracterizaron adicionalmente mediante la ejecución de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y comparando los perfiles con las referencias adecuadas.

Análisis estadístico

30 Los resultados se analizaron usando ensayos estadísticos apropiados. Los ensayos-T se usaron para comparar los pacientes durante los tratamientos. Las posibles relaciones se evaluaron usando el ensayo de correlación de Pearson. Las variaciones en el recuento bacteriano se analizaron usando el ensayo de Wilcoxon-Mann-Whitney. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el paquete estadístico SPSS.

Resultados

a) Eficacia clínica

40 46 pacientes afectados por DA completaron el estudio clínico; se excluyeron 2 pacientes (1 paciente por grupo). La evaluación del SCORAD (índice SCORAD) y el DLQI se hizo durante los exámenes de seguimiento. Los pacientes tratados con los probióticos mostraron una reducción significativa en el SCORAD al final del tratamiento (p=0,001) que también se mantuvo tras la suspensión del tratamiento (p=0,006) (Tabla 2).

45 De manera análoga, el DLQI mostró una mejora en los pacientes tratados con la mezcla probiótica (inscripción frente a 3 meses de tratamiento: p=0,021; inscripción frente a 2 meses tras la suspensión: p=0,001). En el grupo de los pacientes a los que se les administró el placebo, no se observó ninguna diferencia significativa ni en términos de SCORAD ni de DLQI (Tabla 2).

b) Concentración de LPS en plasma

50 La concentración de LPS es un índice de traslocación microbiana; un aumento en la concentración de LPS se asocia con alteraciones en la permeabilidad intestinal. El tratamiento con las dos cepas probióticas indujo una reducción en la concentración de LPS en plasma, que se mantuvo tras la interrupción de la terapia (línea de base frente a 3 meses de tratamiento: p=0,050; línea de base frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: p< 0,001; 3 meses de tratamiento frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: p< 0,001), como se muestra a continuación (Tabla 3).

Tabla 3

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	71,71	56,64
3 meses de tratamiento	53,17	76,7
2 meses tras la suspensión	36	119,61

60 En los pacientes tratados con el placebo se observó un aumento significativo en los niveles de LPS en plasma durante el periodo de estudio (línea de base frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: p=0,004; 3 meses de tratamiento frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: p=0,0160) (Tabla 3). Al final del estudio, la

concentración de LPS en plasma era significativamente mayor en el grupo control (placebo) en comparación con el grupo de tratamiento ($p < 0,001$).

c) Linfocitos T activados

5 Las células T CD8+ activadas se analizaron evaluando la expresión en las mismas de las moléculas CD38 y CD45. Se observó una reducción progresiva en dichas células durante el periodo de estudio en los pacientes tratados con los dos probióticos (línea de base frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p < 0,001$; 3 meses de tratamiento frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p < 0,001$) (Tabla 4). No se observó ninguna diferencia significativa en el grupo placebo.

Tabla 4

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	2,51	1,8
3 meses de tratamiento	2,08	1,61
2 meses tras la suspensión	1,19	1,3

d) Células T reguladoras (Treg)

15 Las células T reguladoras se evaluaron tanto en ausencia de estimulación como tras la estimulación con LPS. Tras el tratamiento con la mezcla probiótica, el porcentaje de linfocitos Treg no estimulados se aumentó significativamente (línea de base frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p = 0,002$; 3 meses de tratamiento frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p = 0,034$) (Tabla 5A y Tabla 5B). Se obtuvieron resultados similares del análisis tras la estimulación con LPS.

Tabla 5A

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	18,57	33,22
3 meses de tratamiento	23,08	32,08
2 meses tras la suspensión	39,12	27,22

Tabla 5B

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	19,85	16,77
3 meses de tratamiento	24,99	28,31
2 meses tras la suspensión	31,8	22,38

e) Expresión de los receptores tipo Toll en linfocitos T reguladores

25 La expresión de los receptores tipo Toll 2 (TLR-2) y 4 (TLR-4) se evaluó directamente en sangre venosa periférica. Como se muestra en la Tabla 5C y la Tabla 5D, la expresión de ambas moléculas en los linfocitos Treg se aumentó significativamente tras 3 meses de administración de probióticos; este resultado también se mantuvo 2 meses tras la suspensión del tratamiento (TLR-2: Línea de base frente a 3 meses de tratamiento: $p < 0,001$; línea de base frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p = 0,010$; TLR-4: línea de base frente a 3 meses de tratamiento: $p < 0,001$; línea de base frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p = 0,011$). En el grupo control (placebo), se observó una disminución significativa en la expresión de la molécula TLR-2 por los linfocitos Treg al final del estudio (3 meses de tratamiento frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p = 0,009$).

Tabla 5C

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	8,67	16,67
3 meses de tratamiento	30,89	23
2 meses tras la suspensión	23,78	12,51

Tabla 5D

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	9,27	17,02
3 meses de tratamiento	31,17	22,97
2 meses tras la suspensión	22,67	18,87

f) Subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2 y Th17

40 Las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2 y Th17 se evaluaron en ausencia de estimulación y tras la estimulación con LPS en ambos grupos sometidos a análisis: el porcentaje de la subpoblación Th1, identificada en base a la expresión de las moléculas CD4 y Tbet y que secreta la citoquina IFN- γ , se aumentó significativamente en los

5 sujetos tratados con la mezcla probiótica, tanto en ausencia de estimulación como tras la estimulación con LPS (sin estimulación: línea de base frente a 3 meses de tratamiento: $p=0,003$; LPS: línea de base frente a 3 meses de tratamiento: $p=0,025$; línea de base frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p=0,019$) (Tabla 6A y Tabla 6B). En los pacientes tratados con los probióticos, se observó dos meses después del final del tratamiento una

Tabla 6A

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	0,11	0,18
3 meses de tratamiento	0,23	0,2
2 meses tras la suspensión	0,16	0,14

Tabla 6B

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	0,09	0,13
3 meses de tratamiento	0,19	0,21
2 meses tras la suspensión	0,18	0,1

10 El porcentaje de la subpoblación de célula Th2, identificadas en base a la expresión de las moléculas CD4 y GATA3 y que secreta la citoquina IL-4, se aumentó significativamente durante la administración de probióticos pero tras la suspensión de la terapia disminuyó de nuevo (sin estimulación: línea de base frente a 3 meses de tratamiento: $p=0,016$; 3 meses de tratamiento frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p=0,005$; LPS: línea de base frente a 3 meses de tratamiento: $p=ns$; 3 meses de tratamiento frente a 2 meses tras la suspensión del tratamiento: $p=0,0045$) (Tabla 6C y Tabla 6D).

Tabla 6C

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	0,85	0,45
T 1	0,26	0,19
T 2	0,9	0,41

Tabla 6D

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	0,81	0,61
T 1	0,45	0,3
T 2	1,69	0,07

25 El porcentaje de la subpoblación de célula Th17, identificada en base a la expresión de las moléculas CD4 y ROR γ T y que secreta la citoquina IL-17, se disminuyó en los pacientes tratados con los probióticos tras 3 meses de tratamiento (sin estimulación: línea de base frente a 3 meses de tratamiento: $p=0,037$; LPS: línea de base frente a 3 meses de tratamiento: $p=0,046$) (Tabla 6E y Tabla 6F). Dos meses después de la suspensión del tratamiento se observaron diferencias significativas entre los dos grupos sometidos a análisis en cuanto a las subpoblaciones de linfocitos Th2 y Th17 ($p=0,008$ y $p=0,031$, respectivamente). No se encontró ninguna diferencia significativa en las poblaciones de células Th1, Th2 y Th17 en los sujetos del grupo control (placebo).

Tabla 6E

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	0,18	0,14
3 meses de tratamiento	0,1	0,18
2 meses tras la suspensión	0,12	0,04

Tabla 6F

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	0,17	0,15
3 meses de tratamiento	0,1	0,12
2 meses tras la suspensión	0,11	0,1

g) Relaciones Th1/Th2 y Th17/Treg

35 Tras 3 meses de administración de probióticos, se observó un aumento significativo en la relación Th1/Th2 ($p=0,028$) (Tabla 7A). Este efecto se perdió tras la interrupción del tratamiento ($p=0,002$). Por el contrario, en el grupo tratado con la mezcla bacteriana, la relación Th17/Treg disminuyó progresivamente y este resultado también se encontró 2 meses después de la interrupción de la terapia ($p=0,029$). Durante el estudio los sujetos inscritos en el

40 grupo control (placebo) no mostraron ninguna variación significativa en las relaciones Th1/Th2 y Th17/Treg. La

relación Th17/Treg era significativamente mayor en el grupo placebo en comparación con el grupo probiótico tras 3 meses de tratamiento ($p=0,037$) (Tabla 7B).

Tabla 7A

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	0,48	0,74
3 meses de tratamiento	1,27	0,95
2 meses tras la suspensión	0,49	0,95

5

Tabla 7B

	Pacientes con probióticos	Placebo
Línea de base	1,075	0,94
3 meses de tratamiento	0,57	1,19
2 meses tras la suspensión	0,62	0,333

h) Correlaciones

10 En los pacientes a los que se les administraron los probióticos, al final del tratamiento se observó una correlación negativa entre el SCORAD y el porcentaje de linfocitos Treg tras la estimulación con LPS ($p=0,020$) y entre el porcentaje de linfocitos T CD8+ activados y el de las células T estimuladas con LPS ($p=0,046$).

15 Se observó una correlación positiva significativa entre la concentración de LPS en plasma y el porcentaje de células Th2 no estimuladas ($p=0,016$), entre la concentración de LPS en plasma y el porcentaje de células Th17 estimuladas con LPS ($p=0,04$) y entre el porcentaje de linfocitos T CD8+ activados y el de las células Th17 estimuladas con LPS ($p=0,037$).

i) Modificaciones de la microbiota fecal y detección de las cepas de *L. salivarius* y *B. breve*

20

Los recuentos celulares en el momento de inscripción, tras 3 meses de tratamiento y 2 meses después del final de la administración se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

	Línea de base	3 meses tratamiento	2 meses tras la suspensión
Pacientes con probióticos			
Aerobios totales	7,7 ± 1,0	7,9 ± 0,9	8,2 ± 0,7
Enterobacteriaceae	6,8 ± 1,3	7,3 ± 1,2	6,7 ± 2,6
Staphylococci	4,0 ± 1,6	2,8 ± 1,5 ^{*◇}	2,3 ± 1,6 ^{*◇}
Lactobacilli	5,4 ± 2,0	5,1 ± 1,8	5,5 ± 0,4
Bifidobacteria	9,1 ± 0,6	8,8 ± 0,5	8,4 ± 0,6
Pacientes con placebo			
Aerobios totales	7,1 ± 1,5	7,5 ± 1,2	7,7 ± 1,3
Enterobacteriaceae	5,8 ± 1,7	6,7 ± 1,6	6,2 ± 1,5
Staphylococci	4,1 ± 0,9	3,9 ± 1,1	4,0 ± 1,1
Lactobacilli	5,4 ± 1,9	5,2 ± 1,6	5,4 ± 1,8
Bifidobacteria	8,5 ± 1,1	8,6 ± 0,6	8,6 ± 0,9

25 * Disminución de la significación ($P<0,05$) en comparación con la línea de base
 ◇ diferencia significativa ($P<0,05$) en comparación con el placebo en el mismo tiempo.

30 En el grupo control (placebo), no se encontraron alteraciones significativas en la flora fecal. En el grupo tratado con probióticos, tras 3 meses se detectó una disminución significativa en staphylococci. Este descubrimiento también era significativo en comparación con el grupo control tras 3 meses de tratamiento. La disminución permaneció estadísticamente significativa incluso dos meses después de la suspensión de los probióticos. No se encontraron modificaciones significativas en ningún otro grupo microbiano analizado.

35 Los descubrimientos relacionados con las cepas probióticas en las muestras fecales de los sujetos inscritos en el estudio se muestran en la Tabla 9. Todas las colonias con una morfología que correspondía a las de las cepas consideradas, identificadas mediante análisis de PCR y PFGE, eran las correspondientes a las de las cepas previamente identificadas como *L. salivarius* LS01 o *B. breve* BR03.

40 La cepa de *L. salivarius* LS01 se encontró en todos los sujetos tras 3 meses de tratamiento, en una cantidad igual a 10^2 - 10^5 UFC/g. La cepa de *B. breve* BR03 se detectó en el 90 % de los sujetos, tras tres meses de tratamiento, en una cantidad igual a 10^6 - 10^8 UFC/g.

En algunos pacientes, ambas cepas también se aislaron 2 meses después de la suspensión del tratamiento pero en una cantidad menor comparada a las obtenidas inmediatamente tras el final de la administración.

5 El solicitante fue capaz de verificar que las composiciones de la presente invención, en particular las de dicho primer estudio clínico (*Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775 y *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604) y dicho segundo estudio clínico (*Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 y *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980), administradas durante 3 meses a sujetos adultos afectados por dermatitis atópica grave o moderada, demostraron ser capaces de mejorar los parámetros clínicos e inmunológicos de los mismos. En particular, al final del tratamiento
10 probiótico, se observó lo siguiente:

- 1) una mejora significativa en el índice SCORAD y DLQI;
- 2) una reducción en la translocación microbiana (niveles de LPS en plasma) y en la activación de linfocitos T CD8+;
- 15 3) un aumento en el porcentaje tanto de los linfocitos T reguladores (Treg) totales, como de los mismos que expresan los marcadores TLR2 y TLR4;
- 4) una mejora en las relaciones Th1/Th2 y Th17/Treg.

20 De manera ventajosa, se demostró que las cepas probióticas usadas eran capaces de colonizar el aparato gastrointestinal de los pacientes y de reducir la carga de estafilococos en las heces.

De manera ventajosa, el efecto clínico de la administración de los probióticos, en términos de mejora de los síntomas de la patología y calidad de vida, se manifestó por sí mismo tras 3 meses de tratamiento. Dicho efecto
25 mostró continuar incluso 2 meses después de la suspensión del tratamiento.

De manera ventajosa, también se observó la persistencia de las 3 cepas bacterianas probióticas (*Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 y *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980) en el aparato gastrointestinal tras la suspensión del tratamiento, sugiriendo la capacidad de las combinaciones bacterianas específicas para colonizar el intestino.
30

Las alteraciones en la permeabilidad intestinal desempeñan un papel clave en la patogénesis de la dermatitis atópica y en otras enfermedades caracterizadas por un componente inflamatorio. Los resultados obtenidos del estudio clínico demuestran un aspecto importante, que se representa por la presencia de una correlación negativa entre los niveles de LPS en plasma y la atopía. Específicamente, la presencia de una mejora significativa en la translocación microbiana tanto durante como después del tratamiento probiótico demostró el efecto inmunomodulador que poseen las 3 cepas bacterianas, capaces de mejorar la barrera intestinal actuando tanto directa como indirectamente.
35

Los estudios en infecciones por VIH han mostrado una asociación entre la translocación microbiana y la activación inmunológica con una pérdida de células-T excesiva. La evaluación del porcentaje de linfocitos T CD8+ activados, considerados un factor pronóstico importante en las infecciones por VIH, es uno de los marcadores más ampliamente aceptados de activación mediada por LPS del sistema inmunitario. Como se esperaba, en los pacientes afectados por dermatitis atópica inscritos en el presente estudio, se observó una reducción en los valores de LPS en plasma junto con un descenso en las células T CD8+ activadas. Estos datos demuestran que las cepas bacterianas ensayadas tienen una fuerte actividad inmunomoduladora como consecuencia de su capacidad para aumentar la barrera intestinal. En el grupo placebo no se observó esta correlación.
40
45

Se identificaron cuatro subpoblaciones diferentes de linfocitos auxiliares T CD4+ en base a su capacidad para secretar citoquinas: Th1, principales productores de IFN- γ e IL-2, que están implicados en las respuestas inmunitarias mediadas por células; Th2, que secretan IL-4, que son responsables de la activación de la respuesta humoral; Th17, que secretan IL-17, IL-21 e IL-22, que están implicados en las respuestas inmunitarias dirigidas contra patógenos extracelulares y en enfermedades autoinmunes; células T reguladoras con una función inmunoreguladora que controlan la hiperactivación de las respuestas inmunitarias.
50

55 Se ha informado de un descenso en las células Treg en pacientes con dermatitis atópica y asma, y su número se correlaciona inversamente con la secreción de IgE, eosinofilia, y los niveles de IFN- γ .

La ingesta de las cepas probióticas indujo un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos Treg totales y un aumento significativo en los linfocitos Treg que expresan los receptores TLR-2 y TLR-4 tras el tratamiento. Estas subpoblaciones celulares realizan una actividad inmunosupresora como su función principal.
60

La colonización de *S. aureus* es una cuestión crucial para la progresión de la dermatitis atópica, al igual que es la correlación positiva entre la gravedad de la enfermedad y la colonización por *S. aureus*. Los efectos beneficiosos de los probióticos pueden deberse a la recuperación mediada por las células Treg de la tolerancia inmunológica hacia *S. aureus* y bacterias Gram negativas. Además, se encontró una correlación negativa entre el índice SCORAD y las células Treg, sugiriendo un papel positivo de las últimas en la evolución de la dermatitis atópica.
65

- El subtipo Th2 desempeña un papel crítico en la patogénesis de las reacciones alérgicas y es responsable de la fase aguda de la dermatitis atópica, mientras que la subpoblación Th1 tiene una función protectora que se asocia con la fase crónica de la enfermedad. En los pacientes afectados por dermatitis atópica, las células Th17 están
- 5 aumentadas en las lesiones agudas de la piel pero no en las lesiones crónicas y se correlacionan positivamente con la gravedad de la enfermedad. Los datos obtenidos en este estudio han mostrado que esta nueva combinación de probióticos aumenta la funcionalidad de las células Th1 en detrimento de las subpoblaciones de Th2 y Th17, por lo tanto aumentando las relaciones Th1/Th2 y Th17/Treg.
- 10 Los subtipos Th2 y Th17 se correlacionan positivamente con los niveles de LPS en plasma, sugiriendo una fuerte interacción entre la translocación microbiana y las modificaciones del sistema inmunitario. Este descubrimiento se confirma adicionalmente por la correlación positiva entre Th17 y CD8+ activados.
- 15 Además se ha demostrado ampliamente el papel realizado por la flora intestinal microbiana en el desarrollo de la tolerancia inmunológica y en la patogénesis de las enfermedades alérgicas. La alteración en la microflora intestinal desempeña un papel en el comienzo de la dermatitis atópica y en el empeoramiento de los síntomas en la piel. Los mismos autores, cuando analizaron la composición de la microbiota fecal de los niños jadeantes y no jadeantes sensibilizados, observaron que las lactobacterias y las bifidobacterias eran similares en ambos grupos.
- 20 En el presente estudio se observó una diferencia significativa en la composición microbiana de los dos grupos analizados, con respecto a Staphylococci. Por lo tanto, es presumible que dicho género pueda tener un papel crucial tanto a nivel de la piel como en los intestinos de los pacientes afectados por dermatitis atópica y que la administración de la presente combinación probiótica pueda reequilibrarlo.
- 25 El presente estudio clínico ha mostrado que las cepas bacterianas de la presente invención se toleran bien, y son capaces de colonizar el aparato intestinal y de inducir efectos clínicos beneficiosos en los sujetos afectados por dermatitis atópica a través de la modulación de algunas de las alteraciones inmunopatológicas más importantes típicas de esta enfermedad inflamatoria de la piel.
- 30 La materia objeto de la presente invención es el uso de las cepas bacterianas ensayadas anteriormente y una terapia adicional que apoye al tratamiento de la dermatitis atópica en sujetos adultos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende los siguientes cultivos bacterianos depositados en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ):
- 5
- *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, depositada el 23.07.2009;
 - *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604, depositada el 20.07.2004;
- 10 para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de patologías seleccionadas del grupo que consiste en alergias, atopía, rinitis alérgica, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis atópica, eczema, asma o inmunodeficiencias.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el tratamiento preventivo y/o curativo de la dermatitis atópica y/o eczema.
- 15
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el tratamiento preventivo y/o curativo de la dermatitis atópica.
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición consiste en los siguientes cultivos bacterianos depositados en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ):
- 20
- *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, depositada el 23.07.2009;
 - *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604, depositada el 20.07.2004.
- 25
5. La composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición comprende adicionalmente un cultivo de bacterias probióticas de *Lactobacillus pentosus* (LPS01) DSM 21980.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición consiste en los siguientes cultivos bacterianos depositados en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ): *Lactobacillus salivarius* (LS01) DSM 22775, *Bifidobacterium breve* (BR03) DSM 16604 y *L. pentosus* (LPS01) DSM 21980.
- 30
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dichos cultivos bacterianos están presentes en dichas composiciones en forma de bacterias vivas, bacterias muertas o componentes celulares, extractos celulares o lisados de las mismas.
- 35
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha composición está en forma sólida para administración oral.
- 40
9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que dichos cultivos de bacterias probióticas están presentes a una concentración que comprende de 1×10^7 a 1×10^{11} UFC/g de composición, preferentemente de 1×10^8 a 1×10^{10} UFC/g de composición.
- 45
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha composición comprende adicionalmente fibras dietéticas con actividad prebiótica seleccionadas de entre fructooligosacáridos (FOS), inulina y goma guar parcialmente hidrolizada (PHGG).
- 50
11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicha composición es una composición farmacéutica, dietética, nutricional o nutrécutica.

FIGURA 1

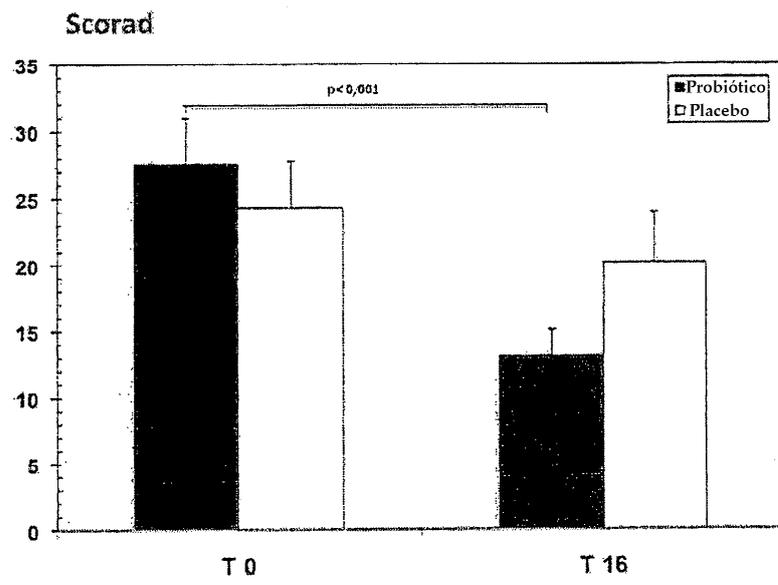


Tabla 2

	Pacientes con probióticos (n=31)			Placebo (n=15)			p*
	línea de base	Tras 3 meses de tratamiento	2 meses tras la suspensión	línea de base	Tras 3 meses de tratamiento	2 meses tras la suspensión	
Índice SCORAD	46,25 ± 3,70	29,45 ± 2,01	22,63 ± 2,81	35,00 ± 2,60	28,21 ± 1,53	27,43 ± 1,38	Línea de base frente a tras 3 meses de tratamiento: p<0,001 Línea de base frente a 2 meses tras la suspensión: p=0,006
Índice DLQ	9,16 ± 0,80	6,58 ± 1,25	4,73 ± 0,75	6,52 ± 0,40	8,50 ± 1,27	5,29 ± 0,97	Línea de base frente a tras 3 meses de tratamiento: p<0,024 Línea de base frente a 2 meses tras la suspensión: p=0,001

* diferencias significativas en los pacientes con probióticos.

Tabla 9

	<i>L. salivarius</i> LS01		<i>B. breve</i> BR03	
	<i>Recuperación en heces (% de pacientes tratados)</i>	<i>Intervalo de recuento (UFC/g)</i>	<i>Recuperación en heces (% de pacientes tratados)</i>	<i>Intervalo de recuento (UFC/g)</i>
Tras 3 meses de tratamiento	100 %	$10^2 - 10^5$	90 %	$10^5 - 10^8$
2 meses tras la suspensión	25 %	$10^2 - 10^4$	19 %	$10^5 - 10^7$