

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 916**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74	(2015.01)	A21D 13/00	(2006.01)
A61P 31/12	(2006.01)		
C12N 1/20	(2006.01)		
C12R 1/225	(2006.01)		
C12R 1/25	(2006.01)		
A23C 9/123	(2006.01)		
A23L 2/52	(2006.01)		
A61K 35/747	(2015.01)		
A21D 2/26	(2006.01)		
A21D 8/04	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2006 PCT/SE2006/001138**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2007 WO07040445**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2006 E 06799738 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 1951272**

54 Título: **Uso de Lactobacillus para el tratamiento de infecciones por virus**

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:
24.11.2016

73 Titular/es:

PROBI AB (100.0%)
Sölvegatan 41
223 70 Lund, SE

72 Inventor/es:

ALENFALL, JAN;
BERGGREN, ANNA;
RASK, CAROLA y
WOLD, AGNES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 590 916 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 Lactobacillus para el tratamiento de infecciones por virus

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de al menos una cepa de bacterias probióticas seleccionadas entre Lactobacillus para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una infección vírica.

Antecedentes de la técnica

10 Las bacterias probióticas se definen como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas afectan beneficiosamente al huésped. Los lactobacilos y las bifidobacterias son las bacterias más frecuentemente utilizadas en productos probióticos. Estas bacterias por lo general son seguras, al igual que los probióticos a base de estos organismos. La falta de patogenicidad se extiende a todos los grupos de edad y a individuos inmunocomprometidos. Se ha demostrado que la ingesta de diferentes bacterias probióticas tiene beneficios clínicos en diversas situaciones fisiológicas o patológicas. Los efectos más evidentes se han demostrado en la diarrea provocada por la terapia antibiótica o por una infección por rotavirus. También existen estudios que muestran efectos clínicos positivos en las enfermedades inflamatorias intestinales, la dermatitis atópica y la hipercolesterolemia posterior a la ingesta de bacterias probióticas. El mecanismo, por el cual las bacterias probióticas contribuyen a estas mejoras clínicas no está claro. Los estudios en seres humanos *in vitro*, así como los estudios en animales *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las diferentes especies de lactobacilos afectan al sistema inmunitario innato y adquirido de muchas maneras diferentes. Los estudios clínicos han demostrado principalmente la estimulación del sistema inmunitario celular innato y la potenciación de la respuesta inmunitaria humoral a las infecciones naturales y la inmunización sistémica u oral. Con respecto a los efectos del sistema inmunitario innato, se ha notificado un aumento de la actividad fagocítica de las células polimorfonucleares (PMN) y un aumento de la actividad de destrucción tumoral de los linfocitos NK. Hasta donde sabemos, no existen estudios clínicos que muestren efectos sobre el sistema inmunitario celular específico tras la ingesta de bacterias probióticas.

25 De acuerdo con la presente invención, los efectos sobre el sistema inmunitario innato y adquirido que siguen a la ingesta diaria de lactobacilos o de la bacteria Gram-negativa *P. lundensis* se han investigado minuciosamente. Curiosamente, se ha observado una activación del sistema inmunitario celular específico en sujetos que recibieron *L. plantarum* e indicios de la misma en sujetos que recibieron *L. paracasei*. Además, se observaron efectos potenciadores de la inmunidad en el sistema inmunitario innato, tales como una expansión de la población de linfocitos NKT y un aumento de la actividad fagocítica en los sujetos que recibieron diferentes especies de lactobacilos. La ingesta de la bacteria Gram-negativa *P. lundensis* no tuvo ningún efecto, pese a todo, sobre los diferentes parámetros inmunológicos medidos de acuerdo con los experimentos que se describen en el presente documento.

35 El desarrollo de resistencia a los antibióticos y los fracasos en diversos tratamientos de infecciones han originado un mayor interés en los probióticos como una herramienta alternativa. Puede existir una necesidad de un producto alimentario funcional probiótico dirigido al problema del resfriado común. Está claro en términos del número elevado de incidencia de infecciones por resfriado cada año. Tradicionalmente, se han tomado alimentos con altos niveles de vitamina C para tratar de reducir la incidencia del resfriado común. En el mercado existen un número de diferentes productos que reivindican algún efecto sobre el sistema inmunitario.

40 La presente solicitud se dirigirá a estudiar si un producto alimentario funcional probiótico, después de su administración regular, podría afectar a los síntomas del resfriado común en un modo similar y, por tanto, puede ser una solución alternativa para este problema en la comunidad general.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona el uso de al menos una cepa de bacterias probióticas, como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención también proporciona una cepa de bacterias probióticas, como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 muestra el número de voluntarios que notificaron cualesquier efectos gastrointestinales adversos menores durante el ensayo.

La Figura 2 muestra los números basales (día 0) de diferentes linfocitos por ml de sangre (media \pm (ETM)).

La Figura 3 muestra los porcentajes basales (día 0) o MGIF (media \pm (ETM)) de linfocitos positivos para los diferentes marcadores de activación celular y de memoria.

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

Figura 5. El porcentaje de linfocitos que expresaban los fenotipos de activación CD8CD25, CD8HLA-DR, CD4CD25 y CD4HLA-DR se analizó mediante citometría de flujo. Se muestran las medias de los grupos (\pm ETM) basadas en razones individuales, día 14/día 0 y día 35/día 0 (para *L. plantarum* y el grupo de placebo solamente).

Figura 6. El porcentaje de linfocitos que expresaban los fenotipos de memoria CD8CD45RO y CD4CD45RO se analizó mediante citometría de flujo. Se muestran las medias de los grupos (\pm ETM) basadas en razones individuales, día 14/día 0 y día 35/día 0 (para *L. plantarum* y el grupo de placebo solamente).

Figura 7. El porcentaje de linfocitos positivos para los marcadores de linfocitos NKT (CD56CD16CD3) se analizó mediante citometría de flujo. Los cálculos de grupo se basan en razones individuales (día 14/día 0).

Figura 8. La actividad fagocítica de los neutrófilos se analizó mediante incubación de células sanguíneas completas con *E. coli* o *S. aureus* marcados con FITC. La razón entre los valores medios de fluorescencia obtenidos el día 14 y el día 0 se determinó individualmente y los cálculos de grupo se muestran en esta figura.

La Figura 9 muestra la razón de linfocitos que expresaban los fenotipos de activación CD4CD25 del experimento 2.

La Figura 10 muestra la razón de linfocitos que expresaban los fenotipos de activación CD4⁺CD25⁺⁺ del experimento 2.

La Figura 11 muestra la razón de linfocitos que expresaban los fenotipos de activación CD8⁺HLA-DR⁺ del experimento 2.

La Figura 12 muestra la razón de linfocitos que expresaban los fenotipos de activación CD8⁺CD25⁺ del experimento 2.

La Figura 13 muestra la razón de linfocitos que expresaban los fenotipos de activación CD4CD45RO del experimento 2.

Descripción detallada de la invención

El *Lactobacillus* utilizado de acuerdo con la invención se selecciona entre el grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434 y *Lactobacillus paracasei* 02A, DSM 13432.

En una realización de la invención se usan al menos dos cepas de bacterias probióticas en la composición farmacéutica. Se pretende que dichas al menos dos cepas se administren secuencialmente o simultáneamente. Por tanto, las cepas pueden administrarse en una mezcla en una composición o pueden administrarse en una secuencia por separado en diferentes composiciones.

De acuerdo con la invención, es posible tratar infecciones víricas seleccionadas entre el grupo que consiste en el virus del resfriado común, el rinovirus, el adenovirus, el virus paragripal, el virus respiratorio sincitial, el enterovirus y el coronavirus.

En el presente contexto la expresión "tratamiento y/o prevención" incluye un tratamiento profiláctico de un individuo, es decir, el tratamiento con las bacterias probióticas se inicia antes de que se haya desarrollado la enfermedad o infección por virus, con el fin de prevenir la enfermedad/infección, así como un tratamiento de una enfermedad/infección que ya se ha desarrollado en un individuo. En este último caso, se espera un alivio de los síntomas, por ejemplo, o que la condición general del paciente se potencie o que el paciente se cure de la enfermedad/infección más rápido. Por tanto, el individuo puede ser una persona en riesgo de desarrollar una infección o no, o ya se ha desarrollado una infección en el paciente.

En una realización de la invención cada una de dicha cepa o cepas está presente en la composición farmacéutica en una cantidad de, pero sin limitación, aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{14} UFC, preferentemente de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{12} y más preferentemente de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{11} .

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede ser, por ejemplo, una formulación líquida o una formulación sólida.

Cuando la composición farmacéutica es una formulación sólida puede formularse como un comprimido, un comprimido para chupar, un dulce, un comprimido masticable, un chicle, una cápsula, un sobre, un polvo, un gránulo, una partícula recubierta, un comprimido recubierto, un comprimido con recubrimiento entérico, una cápsula con recubrimiento entérico, una lámina bucodispersable o una película.

5 Cuando la composición farmacéutica es una formulación líquida puede formularse como una solución, una suspensión, una emulsión o un jarabe orales. Dicha composición puede comprender adicionalmente un material de vehículo seleccionado independientemente entre, pero sin limitación, el grupo que consiste en gachas de harina de avena, alimentos fermentados con ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, hidratos de carbono, proteínas y proteínas glucosiladas.

10 En una realización de la invención, dicha composición farmacéutica es un alimento medicinal, un alimento funcional, un complemento dietético, un producto nutricional o una preparación alimentaria.

15 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención, utilizada de acuerdo con la invención o producida de acuerdo con la invención también puede comprender otras sustancias, tales como un vehículo inerte, o adyuvantes, excipientes, conservantes, etc. farmacéuticamente aceptables, que son bien conocidos por los expertos en la materia.

20 La expresión "composición farmacéutica" no tiene que ser necesariamente una composición farmacéutica en su sentido normal, pero puede formularse como una composición alimentaria, un complemento dietético, un alimento funcional, un alimento medicinal o un producto nutricional, siempre que se consiga el efecto deseado, es decir, el tratamiento o la prevención de infecciones por virus. Dicha composición alimentaria puede seleccionarse entre el grupo que consiste en bebidas, yogures, zumos, helados, panes, galletas, cereales, barras saludables, productos untables y productos nutricionales. La composición alimentaria puede comprender adicionalmente un vehículo, en la que dicho vehículo se elige entre el grupo que consiste en gachas de harina de avena, alimentos fermentados con ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, hidratos de carbono, proteínas y proteínas glucosiladas.

25 Por tanto, el uso de una composición de acuerdo con la invención puede ser muy beneficioso en el sentido de que puede usarse de forma profiláctica, es decir, antes de la infección por virus se haya desarrollado. Puesto que la composición farmacéutica utilizada no es necesariamente una composición farmacéutica en su sentido normal, pero también puede ser un complemento dietético o alimento funcional, es muy conveniente para un individuo sano normal que tome la composición de la invención profilácticamente.

Ejemplos

30 Ejemplo 1

Sujetos y criterios de ensayo

35 Se seleccionaron cincuenta y siete voluntarios aparentemente sanos en el intervalo de edad de 18-55 años (mediana, 26 años) para el presente estudio con ocultación controlado con placebo. Los sujetos se asignaron aleatoriamente a ocho grupos, que recibieron una de las siguientes bacterias Grampositivas, *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 fue de 10^{10} bacterias/día para los lactobacilos y de 10^9 bacterias/día para *P. lundensis*. El grupo control tomó leche en polvo desnatada (1 g). Dependiendo del grupo, el estudio tuvo un período de duración de 6 o 9 semanas que consistía en un período de lavado de dos semanas, un período de estudio activo de 2 o 5 semanas y un período de seguimiento de 2 semanas (Fig. 4). Se suministró a cada sujeto una lista de productos que contenía productos probióticos, que no debían ser consumidos durante todo el período de estudio. Se recogieron muestras de sangre periférica de los sujetos mediante punción venosa en dos o tres puntos temporales, el día 0, el día 14 y el día 35. Durante el ensayo se mantuvo un diario, en el que cada sujeto declaró los efectos adversos, las condiciones de salud y confirmaron el consumo del producto del estudio.

45 Citometría de flujo

50 El análisis fenotípico de los linfocitos en sangre completa se realizó mediante citometría de flujo. Los siguientes anticuerpos monoclonales anti-humanos se usaron como marcadores de superficie para diferentes poblaciones celulares: CD3 FITC (SK7), CD4 APC (SK3), CD8 PerCP (SKI), CD19 PerCP (SJ25C1), CD56 PE (MY31), CD16 PE (B73.1) y CD5 FITC (L17F12). Los siguientes anticuerpos monoclonales anti-humanos se usaron para la detección 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 adquirieron de Becton-Dickinson (Erembodegem, Bélgica). Se incubó sangre completa (100 μ l) con anticuerpos (10 μ l/anticuerpo) durante 30 min a 4 °C en la oscuridad. Posteriormente, se añadieron 2 ml de solución de lisis FACS (Becton-Dickinson) y se incubaron durante 15 min a 20 °C en la oscuridad. Las células se lavaron mediante la adición de 3 ml de FACSFlow y se centrifugaron a 300 x g durante 5 min. Las células lavadas se resuspendieron en 200 μ l de FACSFlow y se analizaron en un FacsCalibur (Becton-Dickinson) con el software CellQuest.

Ensayo de fagocitosis

La actividad fagocítica de los granulocitos y los monocitos se cuantificó con PHAGOTEST® (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, se añadieron 20×10^6 *E. coli* marcadas con FITC o *S. aureus* marcadas con FITC a sangre completa preenfriada (100 μ l). Las células sanguíneas y las bacterias se incubaron a 37 °C durante 10 FacsCalibur con el software CellQuest.

Cálculos

Se determinaron cambios individuales en relación con diferentes parámetros inmunológicos mediante el cálculo de la razón entre los valores individuales obtenidos el día 14 y el día 0, o los valores el día 35 y el día 0. Estas razones se usaron para todos los cálculos de grupo y las estadísticas.

Estadísticas

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando Stat-view. Se usaron test Mann-Whitney U para comparar los diferentes grupos.

Resultados15 Observaciones clínicas

Cincuenta y cuatro de cincuenta y siete voluntarios completaron el estudio. Dos personas fueron excluidas debido a una infección y al tratamiento con antibióticos (uno en el grupo de placebo y uno en el grupo que recibió *P. lundensis*). Una persona fue excluida el día 16 debido a embarazo (grupo de placebo). Solo se notificaron efectos secundarios gastrointestinales adversos leves después de la ingesta de los productos del estudio (Fig. 1).

20 La ingesta de lactobacilos activa los linfocitos T

Hubo grandes variaciones individuales basales (día 0) en relación con los marcadores de activación en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Los porcentajes basales de células que expresan diferentes marcadores de la superficie celular 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 de la razón el día 14 y el día 35 en comparación con el día 0 para cada individuo. Todos los cálculos y comparaciones se realizaron sobre estos valores de razón (día 14/día 0 y día 35/día 0). Después de 14 días de ingesta del producto de estudio que contenía *L. plantarum* 299v un aumento del doble de la expresión del marcador de activación CD25 en los linfocitos T CD8⁺ ($p = 0,01$) (fig. 5). También hubo un fuerte, aunque no significativo ($p = 0,12$), indicio de la regulación positiva de HLA-DR en los linfocitos CD8⁺ después de la ingesta de *L. plantarum* 299v. Además, también se observó una tendencia a la activación de linfocitos T CD4⁺ después de la ingesta *L. plantarum* 299v. La ingesta de las otras especies de lactobacilos incluidas en el presente estudio, así como la bacteria Gramnegativa *P. lundensis* no activó los linfocitos T CD8⁺, ni los CD4⁺. Sin embargo, hubo una tendencia de que la ingesta de *L. paracasei* sí aumentó la expresión de HLA-DR en los linfocitos T CD4⁺ ($P = 0,18$).

La ingesta de lactobacilos induce un fenotipo de memoria en los linfocitos T CD4⁺

Se compararon las medias geométricas de la intensidad de fluorescencia (MGIF) de la expresión de CD45RO en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ entre los grupos que recibieron diferentes productos de estudio. Como anteriormente, se usaron cálculos de grupo basados en valores de razón individuales (día 14/día 0 y día 35/día 0) para las comparaciones. Después de 35 días de ingesta de producto de estudio que contenía *L. plantarum* 299v la MGIF de CD45RO en los linfocitos T CD4⁺ aumentaron significativamente ($p = 0,03$). También hubo una tendencia hacia el aumento de la expresión de CD45RO en los linfocitos T CD8⁺ después de la ingesta de *L. plantarum* (Fig. 6). Además, la ingesta de *L. paracasei* parece tener un efecto positivo en la regulación positiva de CD45RO en los linfocitos T CD8⁺ ($p = 0,10$) (Fig. 6).

Efecto sobre diferentes poblaciones celulares después de la ingesta de producto de estudio

Tras la ingesta de *L. paracasei* hubo un aumento en el porcentaje de linfocitos identificados como linfocitos NKT ($P = 0,06$) (Fig 7). El aumento/disminución relativos en comparación con el día 0 no pudo detectarse con respecto a otras poblaciones celulares, tales como linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, células B, células B-1 (CD19+CD5+), linfocitos NK, granulocitos y monocitos.

Actividad fagocítica

Se identificaron monocitos y granulocitos en el esquema FSC-SSC. Se ensayó la capacidad de estas células para fagocitar bacterias Grampositivas o Gramnegativas marcadas con FITC. Como se muestra en la fig. 8, los granulocitos de los voluntarios a los que se les proporcionó *L. plantarum* 299v ($p = 0,064$), *L. plantarum* Heal 19 ($p = 0,064$), *L. fermentum* ($p = 0,064$) o *L. paracasei* ($p = 0,05$) fueron más eficaces que los granulocitos de los voluntarios tratados con placebo en la fagocitosis de las bacterias Gramnegativas *E. coli*. Sin embargo, no hubo

diferencias entre los grupos en la fagocitosis de las bacterias Grampositivas *S. aureus*. No se pudo detectar ninguna diferencia en la actividad fagocítica de los monocitos (datos no mostrados).

Análisis

5 La tarea principal del sistema inmunitario es reaccionar rápida y violentamente a los microorganismos previniendo y curando, de este modo, las infecciones. La destrucción de microorganismos emplea mecanismos poderosos que también provocan daño a nuestros propios tejidos. Por tanto, es necesario que ni reaccione a nuestros propios tejidos, ni a sustancias inocuas presentes en el medio ambiente. Por tanto, el sistema inmunitario desarrolla y mantiene la tolerancia tanto a los componentes de nuestro propio cuerpo como a los alimentos y las proteínas ingeridas. Si esto fracasa, puede surgir un número de enfermedades. Los medios para desarrollar tolerancia inmune específica son una tarea esencial del sistema inmunitario.

15 El linfocito T auxiliar desempeña un papel central en todas las reacciones inmunitarias. Cuando un linfocito T auxiliar es activado por su antígeno específico, se activa, se divide, madura y produce una gama de citocinas que dirigen la acción de otros tipos de células del sistema inmunitario, tales como los linfocitos T citotóxicos y las células B. La activación de los linfocitos T auxiliares es necesaria con el fin de producir la mayoría de los tipos de reacciones inmunitarias, incluyendo la producción de anticuerpos. A la inversa, si se evita la activación de los linfocitos T auxiliares, la mayoría de los tipos de reacciones inmunitarias se paralizan.

20 Existen varios mecanismos mediante los cuales se garantiza la activación de los linfocitos T auxiliares y el mantenimiento de la tolerancia. Un mecanismo es la eliminación en el timo de los linfocitos T con capacidad de reconocer y reaccionar a los tejidos propios. Sin embargo, esta eliminación no es completa y, además, también necesitamos desarrollar tolerancia inmunitaria específica a los antígenos exógenos. De lo contrario, reaccionaríamos violentamente a todo tipo de sustancias inhaladas e ingeridas, conduciendo a la inflamación masiva y al desperdicio de recursos inmunitarios.

25 Un tipo celular que es importante para el mantenimiento de la tolerancia es el linfocito T regulador. Este tipo celular puede reconocerse por ciertos marcadores, tales como la expresión en la superficie de CD4 y CD25, la posesión de CTLA-4 intracelular y la transcripción de la proteína nuclear Foxp3. Los linfocitos T reguladores son capaces de evitar que otros linfocitos T se activen cuando se enfrentan a sustancias inofensivos y, por tanto, evitan todo tipo de reacciones inmunitarias no deseadas.

30 En el presente contexto, el símbolo "+" en relación con un determinado marcador tal como CD4+ y CD25+ significa que el marcador se expresa en un linfocito T. Por ejemplo, los linfocitos T CD4+CD25+ son linfocitos T que expresan tanto el marcador CD4 como el marcador CD25 en su superficie. Sin embargo, no se dice nada acerca de la cantidad del marcador que se expresa, solo que está presente. En el presente contexto, el símbolo "++" en relación con un marcador tal como CD4++ o CD25++ significa que hay una gran cantidad de marcador expresado. Los linfocitos T reguladores son aquellas células con una gran cantidad de CD25 en la superficie, es decir, células CD4+CD25++. Por otro lado, los linfocitos T CD4+CD25+ son solamente linfocitos T activados. A veces, los símbolos específicos "+" y "++" no se utilizan, por ejemplo, CD4CD25 solamente, y esto significa que las células están activadas, tal como las células CD4+CD25+. Por tanto, CD4CD25 es lo mismo que CD4+CD25+. Cuando se habla de los linfocitos T reguladores, siempre se escriben como células CD4+CD25++.

40 El presente estudio con ocultación controlado con placebo es singular en que es el primer estudio que compara la influencia de varios parámetros inmunológicos después de la ingesta de diferentes lactobacilos Grampositivos o de la bacterias Gramnegativa *P. lundensis*. Curiosamente, la ingesta de *P. lundensis* no influyó en ninguno de los parámetros medidos. Por el contrario, la ingesta de lactobacilos afectó a diferentes componentes del sistema inmunitario tanto específico como innato. Un nuevo descubrimiento del presente estudio fue que la ingesta de *L. plantarum* tuvo un efecto positivo pronunciado en la activación y la inducción de células de memoria en las poblaciones de linfocitos T. Hubo una regulación positiva significativa de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) y una fuerte tendencia a la regulación positiva de HLA-DR en los linfocitos T citotóxicos. Una tendencia a la regulación positiva de estos marcadores de activación también se observó en los linfocitos T auxiliares después de la ingesta de *L. plantarum*. La expresión de marcadores de activación indica que los linfocitos T han comenzado 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 los linfocitos T en reposo. Los mecanismos detrás de la activación de los linfocitos T inducida por *L. plantarum* podrían ser a través de células que presentan antígeno que son activadas por receptores de tipo toll de unión a compuestos microbianos. La activación de las células presentadoras de antígeno las hace más eficaces en la presentación de antígeno a los linfocitos T. Además, los linfocitos T tanto auxiliares como citotóxicos han demostrado tener diversas expresiones de receptores de tipo toll, que probablemente hacen que estas células sean sensibles a la activación no específica por componentes y productos microbianos.

55 En analogía con el compartimento de los linfocitos T auxiliares, la expresión de CD45RO parece marcar una población de memoria también entre los linfocitos T citotóxicos. Se descubrió un aumento significativo en la expresión de este marcador de células de memoria en los linfocitos T auxiliares y una tendencia a la regulación positiva en los linfocitos T citotóxicos después de 35 días de ingesta de *L. plantarum*. Además, la ingesta de *L. paracasei* también mostró una tendencia a la regulación positiva de CD45RO en los linfocitos T citotóxicos.

Respecto a los linfocitos T vírgenes, los linfocitos T CD45RO+ pueden secretar un amplio espectro de citocinas. Además, los linfocitos T CD45RO+ pueden proliferar y producir IL-2 cuando se estimula el complejo CD3-TCR en condiciones subóptimas, mientras que los linfocitos T vírgenes requieren un fuerte estímulo de CD3-TCR para realizar estas funciones. La formación de los linfocitos T de memoria es importante para la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz después de la infección y la vacunación.

El sistema inmunitario celular innato también se vio afectado por la ingesta de bacterias probióticas. Se demostró que la población de linfocitos T citolíticos naturales (NKT) se incrementó después de la ingesta de *L. paracasei*. Los linfocitos NKT constituyen una subpoblación de linfocitos que coexpresan el marcador CD56 de linfocitos NK y el complejo marcador de linfocitos T CD3-receptor de linfocitos T. Los estudios tanto en seres humanos como en ratones han demostrado que los linfocitos NKT desempeñan un papel central en la regulación de enfermedades autoinmunes, tales como la esclerosis múltiple, la diabetes de tipo I y el lupus sistémico. Los linfocitos NKT también ejercen funciones efectoras contra células tumorales o células infectadas por virus. Por tanto, los linfocitos NKT son pleotrópicos en sus funciones. Otros estudios clínicos que evalúan los efectos inmunológicos de las bacterias probióticas han demostrado que la ingesta de *L. rhamnosus* HN001 y *Bifidobacterium lactis* HN019 potencia la actividad de destrucción tumoral de los linfocitos NK (incluyendo NKT) de las células K562. En el presente estudio se confirmó también la observación por otros de que la actividad fagocítica de las células polimorfonucleares se incrementa después de la ingesta de diferentes lactobacilos. La consecuencia de los efectos observados en los diferentes parámetros inmunológicos en el presente estudio es que se podría especular que la activación de los linfocitos T citotóxicos y la expansión de linfocitos NKT, coincidentes, apuntan a una defensa inmunitaria fortalecida contra las infecciones víricas y/o los tumores. El descubrimiento in vitro de que los lactobacilos inducen que las células mononucleares secreten IL-12 e IL-18, respalda la teoría de que la ingesta de estas bacterias estimula la actividad mediada por células.

De acuerdo con la presente invención, se ha llegado a la conclusión de que la ingesta de *L. plantarum* y *L. paracasei* tiene un profundo efecto sobre el sistema inmunitario celular específico e innato. Sin embargo, el aumento de la función inmunitaria demostrado en el presente documento es, por el momento, difícil de relacionar con un beneficio para la salud probado en los seres humanos. Con el fin de abordar este problema específico, necesitan realizarse más ensayos clínicos en personas que padecen, por ejemplo, infecciones víricas o tumores. En estudios de este tipo, sería de especial interés comparar el efecto de la administración de *L. plantarum* y *L. paracasei* por separado o en combinación.

Ejemplo 2

El objetivo de este ejemplo fue investigar el efecto sobre el sistema inmunitario proporcionando las mismas especies de lactobacilos durante un período de tiempo más largo en comparación con varios lactobacilos (diferentes especies) administrados en una secuencia unos después de los otros.

A los voluntarios se les proporcionó un polvo con bacterias liofilizadas durante 14 o 35 días. Como bacterias grampositivas se usó la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum* 299v sola o en combinación con *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. paracasei* y *L. gasseri*. Como bacteria gramnegativa se proporcionó *Pseudomonas lundensis*.

Se estudiaron los siguientes grupos:

- 1) *Lactobacillus plantarum* 35 días
- 2) *L. plantarum* 7d, *L. rhamnosus* 7d, *L. fermentum* 7d, *L. paracasei* 7d, *L. gasseri* 7d. En total 35 días. (Secuencia)
- 3) Una mezcla de *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. gasseri*. En total 14 días
- 4) *L. rhamnosus* 14 días
- 5) *L. fermentum* 14 días
- 6) *L. paracasei* 14 días
- 7) *L. gasseri* 14 días
- 8) *Pseudomonas lundensis* 14 días

Grupo de control 1) Placebo 35 días

Grupo de control 2) Placebo 14 días

Las muestras de sangre se tomaron el día 0, 14 y 35. La cantidad de linfocitos T auxiliares (CD4+) que expresaban grandes cantidades de CD25 se definió en cada grupo mediante citometría de flujo como se ha explicado anteriormente en el experimento 1.

Resultados

El día 14, hubo una significación dudosa de que los linfocitos T CD4+CD25++ se incrementaban en los individuos que consumían la secuencia de cinco cepas de lactobacilos diferentes.

Análisis

5 Los linfocitos T auxiliares (CD4+) que expresaban alta densidad de la molécula CD25 (CD4+CD25++) han demostrado ser importantes para proteger contra las enfermedades autoinmunes, las alergias y las enfermedades inflamatorias intestinales. El descubrimiento de que estas células se incrementaban después de la ingesta de una secuencia de diferentes lactobacilos indica que la ingesta de estas bacterias podría ser beneficiosa para el individuo con respecto al riesgo de desarrollar las enfermedades anteriormente mencionadas.

Experimento 3

10 El objetivo del presente estudio fue investigar si el consumo de las bacterias de ácido láctico en una fórmula/producto alimentario funcional liofilizados durante al menos 3 meses influye en la gravedad de los síntomas y la incidencia y duración del resfriado común.

Era importante que esto se realizase *in vivo* en seres humanos, ya que ni los estudios *in vitro* ni los estudios en animales hubieran reflejado el grado de eficacia cuando se administran a seres humanos. La capacidad de estas bacterias para establecerse en el intestino cuando se administran directamente después del cultivo está documentado en estudios anteriores.

15 Por tanto, el objetivo era investigar si el consumo de una mezcla de *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) y *Lactobacillus paracasei* 8700:2 (DSM 13434) (1×10^9 UFC/d) puede reducir el riesgo de resfriado común.

El estudio se realizó durante 90 días y 500 personas participaron en el estudio. 250 personas recibieron el producto activo y a 250 individuos se les proporcionó un placebo.

El estudio fue aleatorio, con ocultación doble y controlado con placebo con dos grupos paralelos.

20 Los criterios de exclusión fueron los siguientes: intolerancia o alergia conocidas a cualquier ingrediente incluido en las formulaciones; alergia tratada médicamente; tratamiento actual para trastornos gastrointestinales graves; embarazo o lactancia; vacunación contra la gripe en los últimos 12 meses; y fumadores.

25 El probiótico proporcionado: *Lactobacillus plantarum* 299v y *Lactobacillus paracasei* 8700:2 liofilizados. Se añadieron sacarosa, maltodextrina y gelatina hidrolizada como crioprotectores. La dosificación fue una ingesta diaria de 1 g de lactobacilos liofilizados (aproximadamente 1×10^9 UFC/día). La dosis se tomó junto con el desayuno.

30 Los productos se produjeron, se empaquetaron y se etiquetaron por Probi AB, Lund, Suecia. La calidad del producto también se controló por Probi AB. Cada sobre se etiquetó con el nombre del estudio, la fecha de caducidad, la forma en que se iban a almacenarse, el nombre del fabricante, el nombre del investigador responsable y su teléfono. Además de la información anterior, se añadió un número que representaba el sujeto en el envase secundario. Se insertó una instrucción detallada para la disolución y la ingesta en el envase secundario. El producto se suministró en sobres.

Desde el día -14 hasta el día 104, el sujeto no podía ingerir productos que contuvieran bacterias probióticas. Al sujeto se le proporcionó una lista de productos probióticos que no tenía permitido consumir durante el período de estudio.

35 Las muestras fecales debían entregarse los días 1 (antes de la ingesta del producto de estudio), 15 (después de la ingesta) y 104 (después de la ingesta). Las muestras debían recogerse en dos tubos no más de 18 horas antes de entregarse para su análisis y durante este período debían almacenarse en el frigorífico. Las muestras se analizaron para detectar lactobacilos.

Las muestras de sangre debían tomarse los días 1 y 15. Las muestras se analizaron para detectar CD4+ y CD8+.

40 A la vista de los experimentos 1 y 2 se esperaba que se viera una protección potenciada contra el resfriado común en los individuos que tomaban la mezcla de probióticos en comparación con el grupo de placebo.

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos una cepa de bacterias probióticas de *Lactobacillus* seleccionada entre el grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434 y *Lactobacillus paracasei* 02A, DSM 13432, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una infección vírica seleccionada entre el grupo que consiste en virus del resfriado común, rinovirus, adenovirus, virus paragripal, virus respiratorio sincitial, enterovirus y coronavirus.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se usan al menos dos cepas de bacterias probióticas.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichas al menos dos cepas se administran secuencial o simultáneamente.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha composición farmacéutica es una formulación líquida o una formulación sólida.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha formulación sólida se elige entre el grupo que consiste en comprimidos, comprimidos para chupar, dulces, comprimidos masticables, chicles, cápsulas, sobres, polvos, gránulos, partículas recubiertas y comprimidos recubiertos, comprimidos y cápsulas con recubrimiento entérico, y láminas y películas bucodispersables.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha formulación líquida se elige entre el grupo que consiste en soluciones, suspensiones, emulsiones y jarabes orales.
7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha composición farmacéutica comprende un material de vehículo.
8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha composición farmacéutica es un alimento medicinal, un alimento funcional, un complemento dietético, un producto nutricional o una preparación alimentaria.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho material de vehículo se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en almidón resistente, fibras dietéticas, hidratos de carbono, proteínas y proteínas glucosiladas.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha preparación alimentaria se selecciona entre el grupo que consiste en bebidas, yogures, zumos, helados, panes, galletas, cereales, barras saludables y productos untables.
11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que cada cepa está presente en la composición en una cantidad de 1×10^6 a 1×10^{14} UFC, preferentemente de 1×10^8 a 1×10^{12} y más preferentemente de 1×10^9 a 1×10^{11} .
12. Una cepa de bacterias probióticas de *Lactobacillus* seleccionada entre el grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313, *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, DSM 13434 y *Lactobacillus paracasei* 02A, DSM 13432, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección vírica seleccionada entre el grupo que consiste en virus del resfriado común, rinovirus, adenovirus, virus paragripal, virus respiratorio sincitial, enterovirus y coronavirus.
13. Una cepa para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que se usan al menos dos cepas de bacterias probióticas.
14. Una cepa para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dichas al menos dos cepas pueden administrarse secuencial o simultáneamente.

Fig. 1

	Período de lavado		Período de estudio					Período posterior al	
	(Semana)		(Semana)					estudio (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

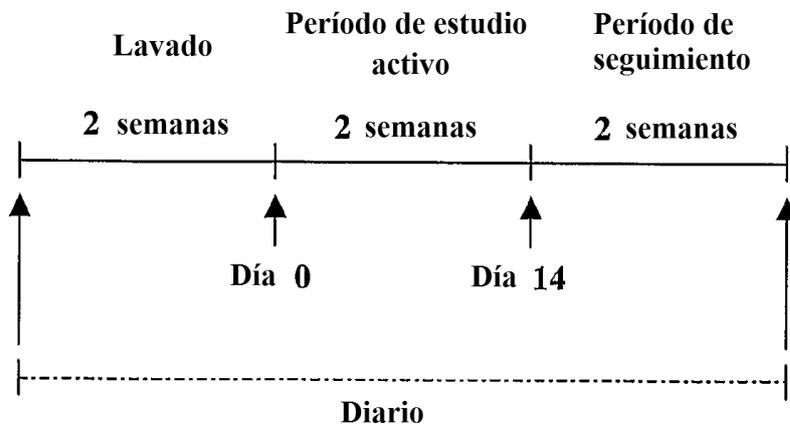
Fig. 2.

	Linfocitos T CD4+ (x 10 ³)	Linfocitos T CD8+ (x 10 ³)	Linfocitos NKT (x 10 ³)
<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.

	%deCD4+CD25+ de linfocitos	% de CD8+CD25+ de linfocitos	% de CD4+HLA-DR+ de linfocitos	% de CD8+HLA-DR+ de linfocitos	MGIF de CD45RO en linfocitos T CD4+	MGIF de CD45RO en linfocitos 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. rhammosus</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

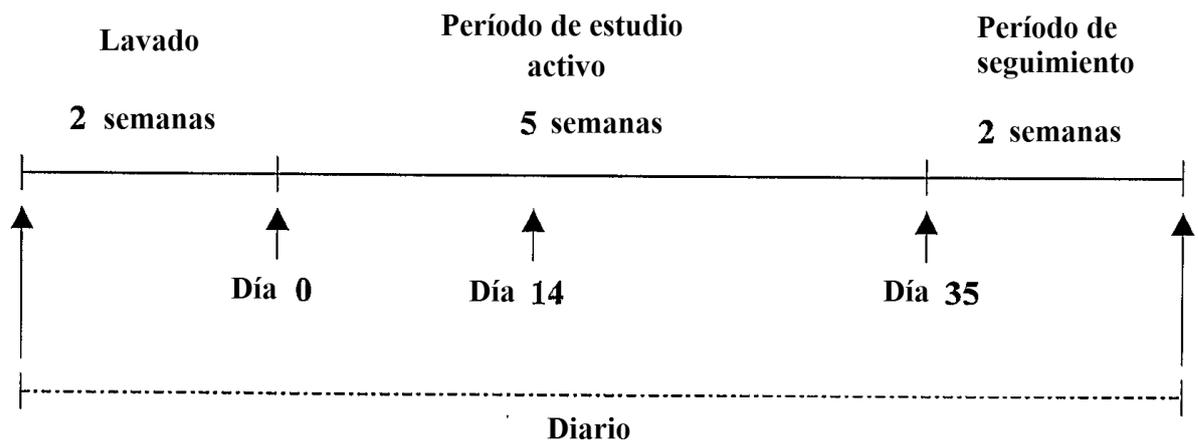


Fig. 4

Fig. 5

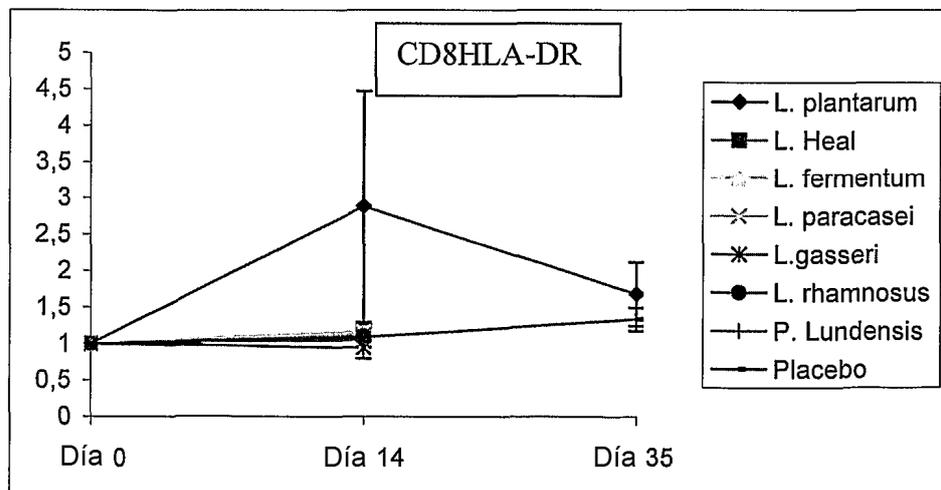
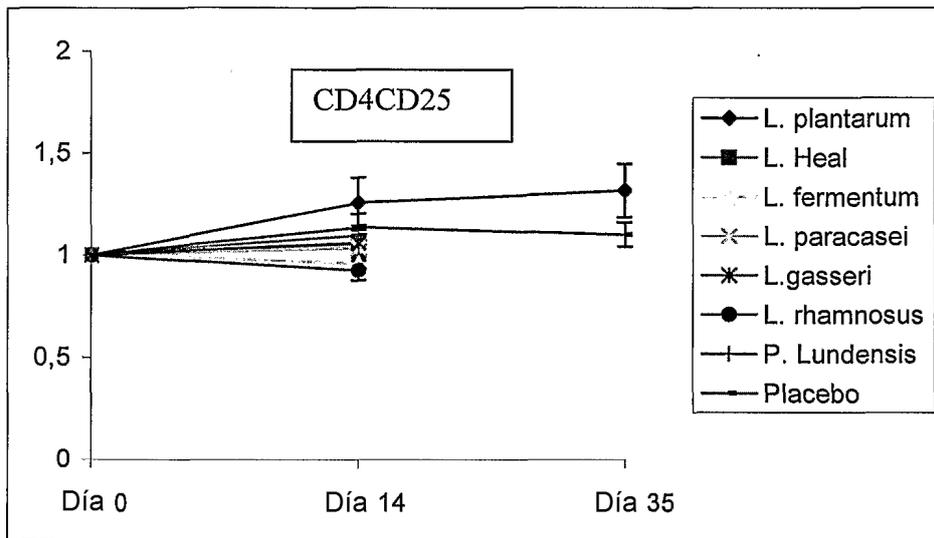
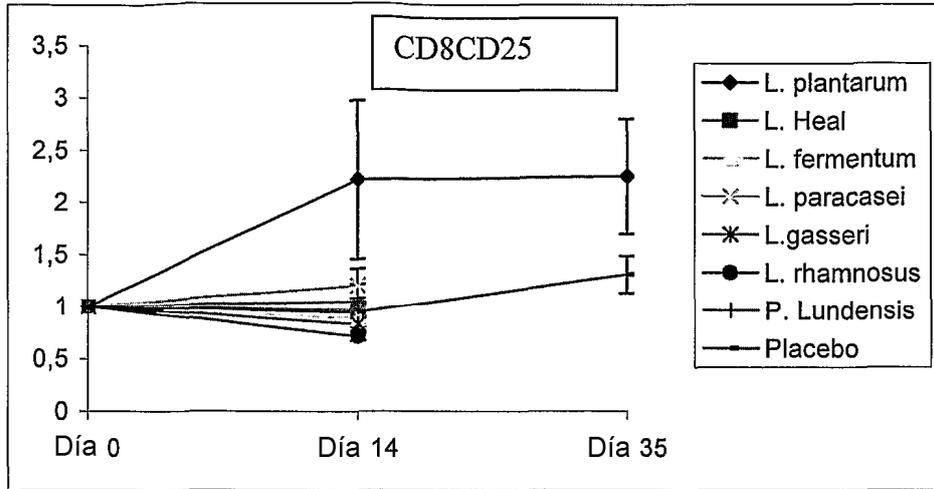


Fig. 5 (continuación)

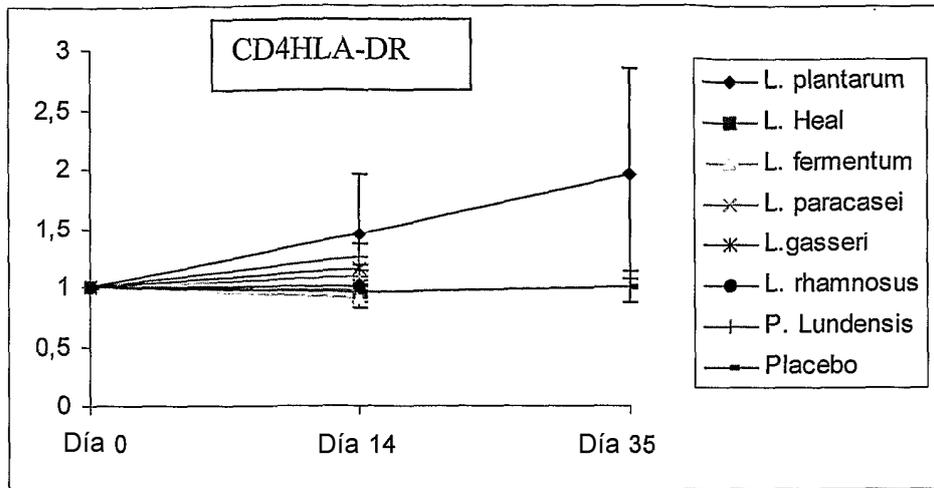
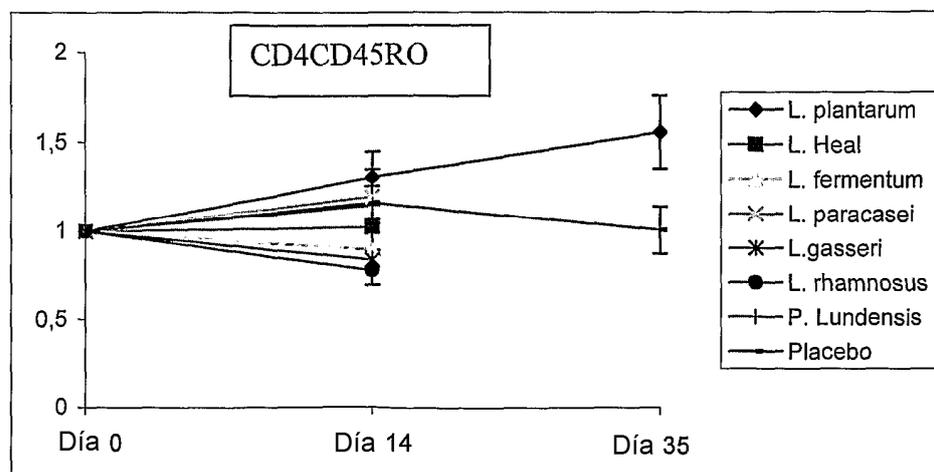
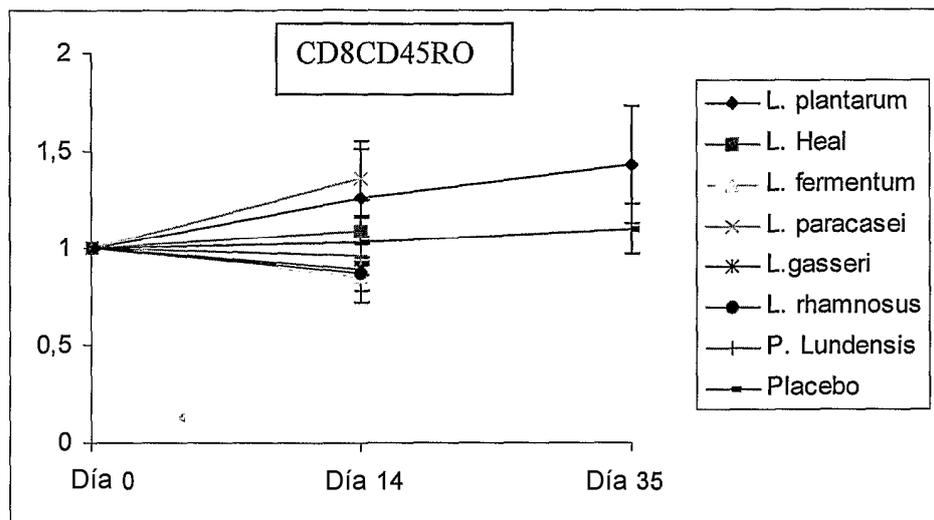


Fig. 6.



Linfocitos NKT

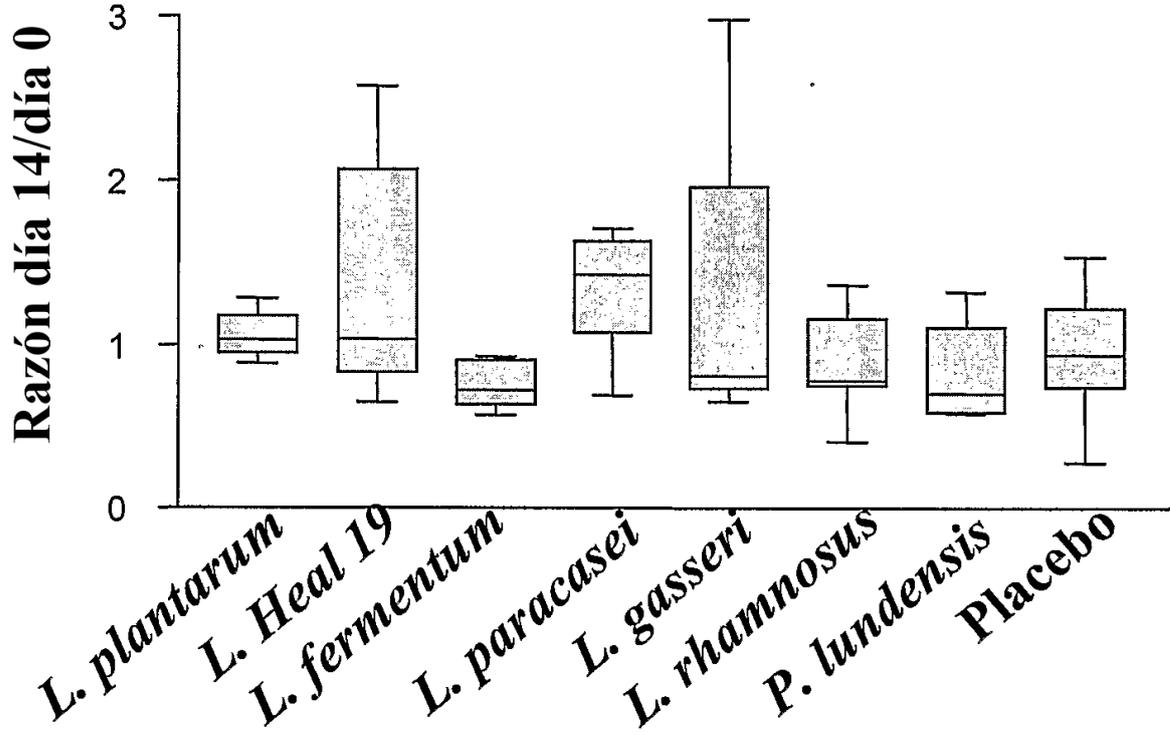


Fig. 7

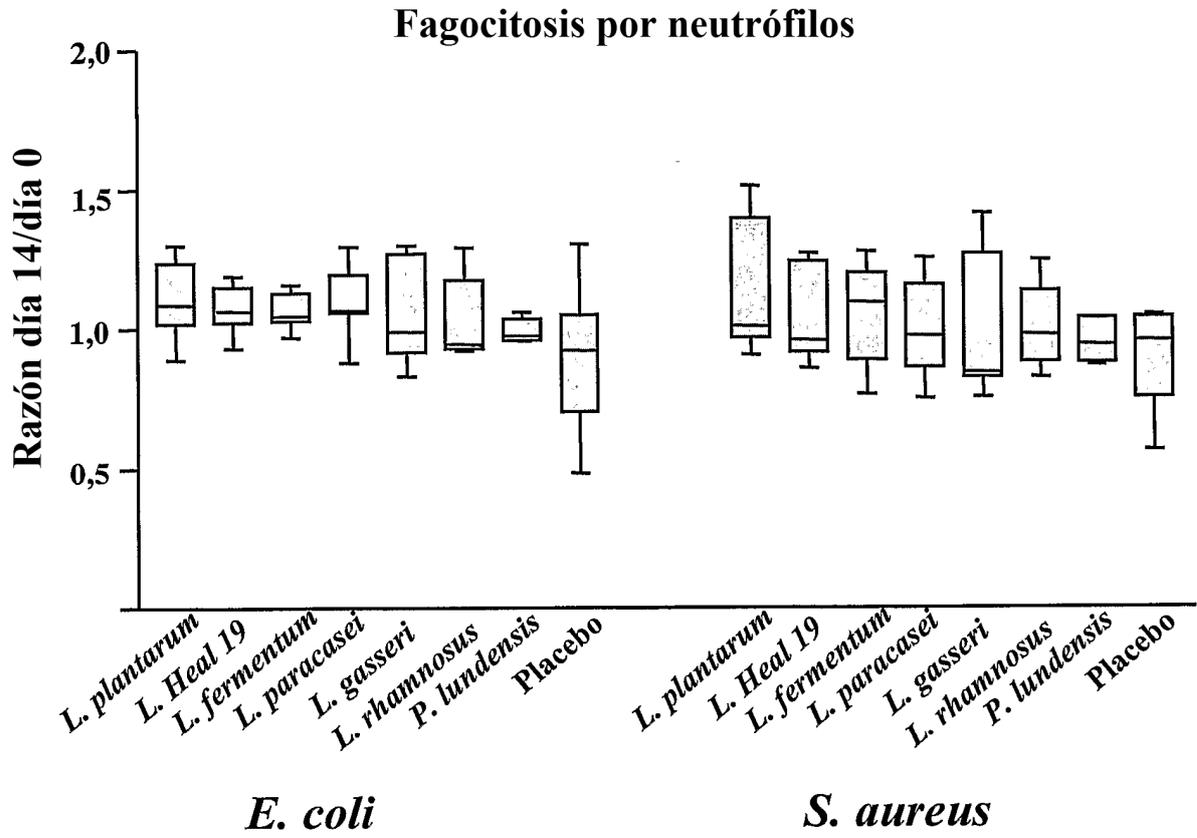
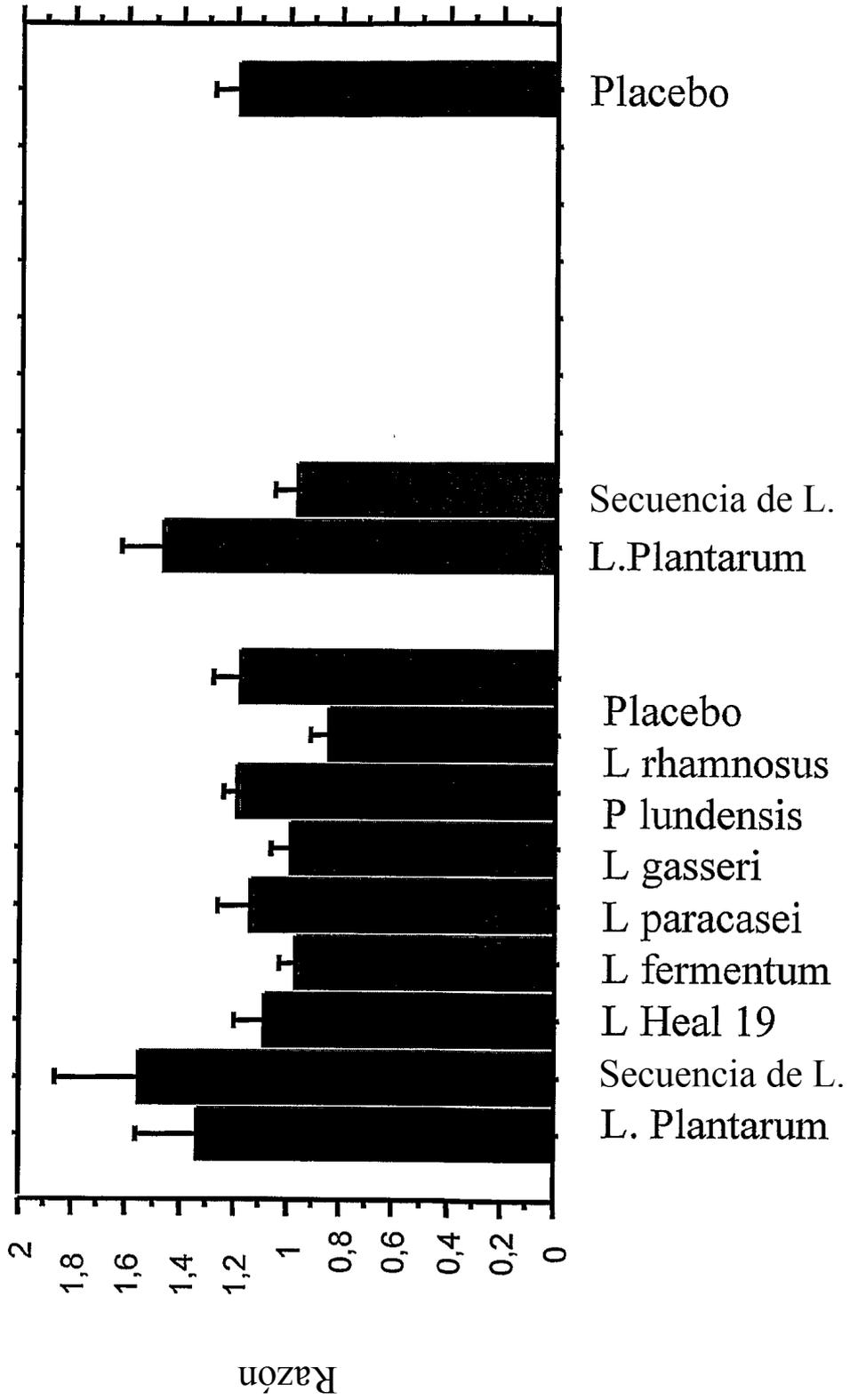


Fig. 8

Fig. 9

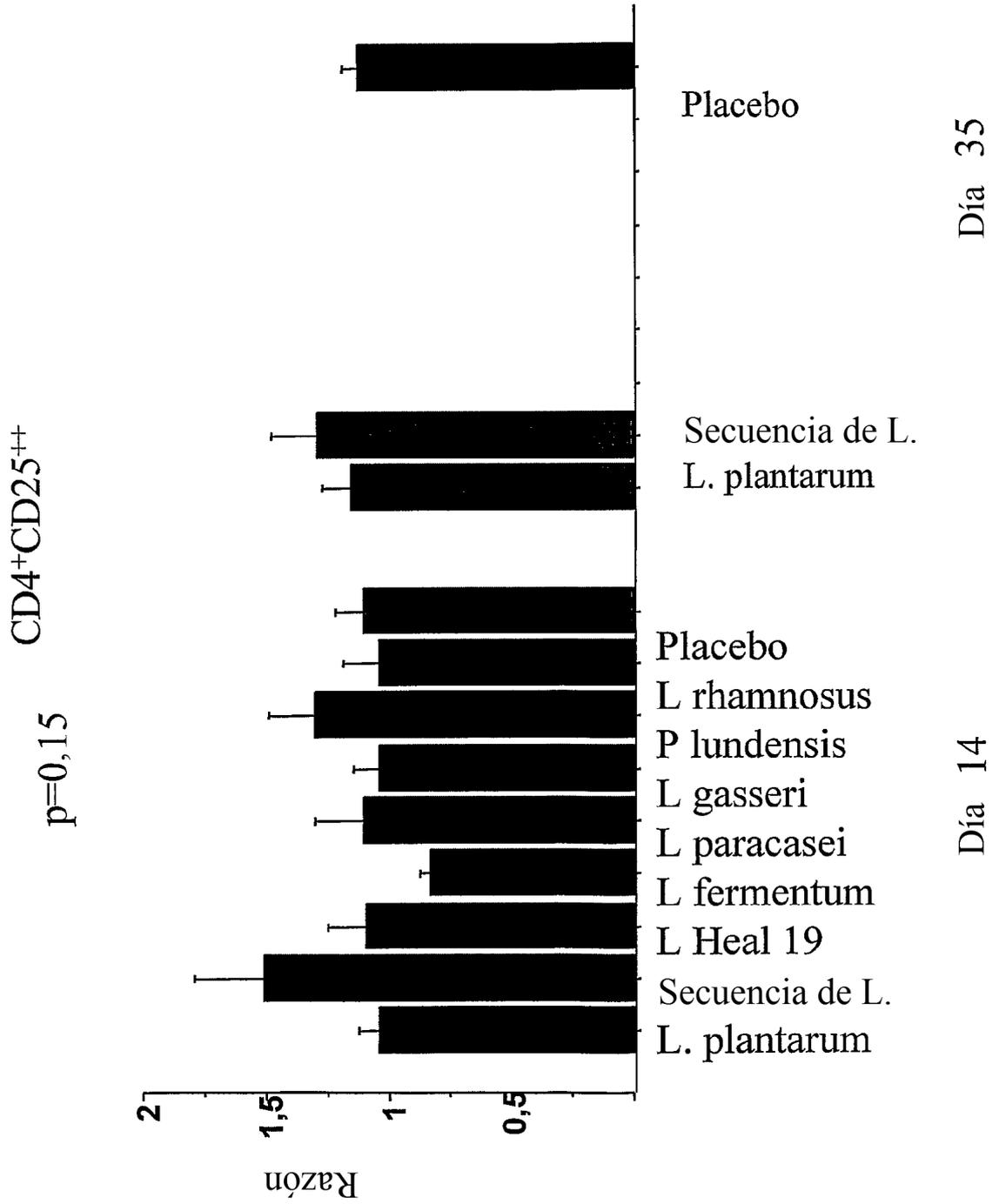
CD4CD25



Día 35

Día 14

Fig. 10



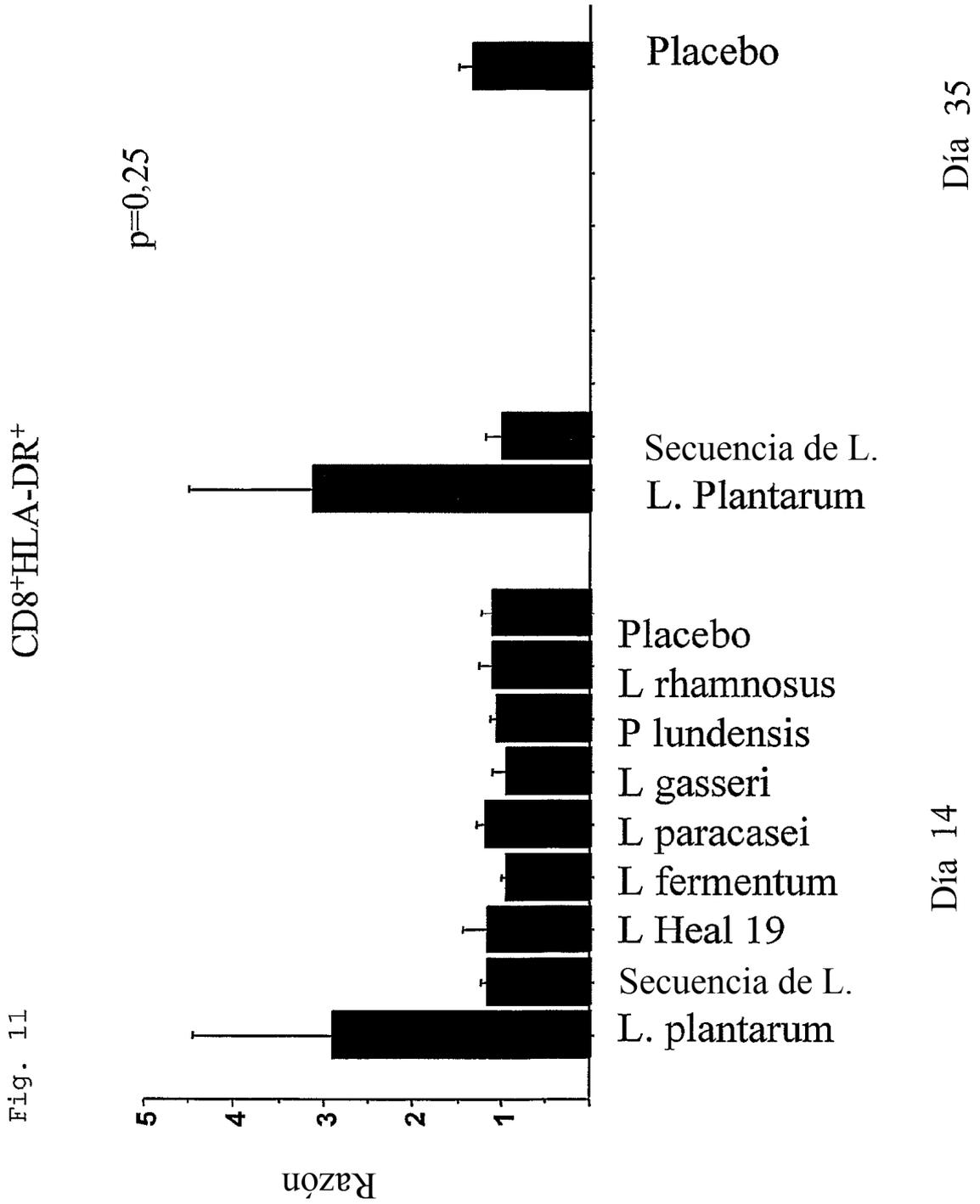
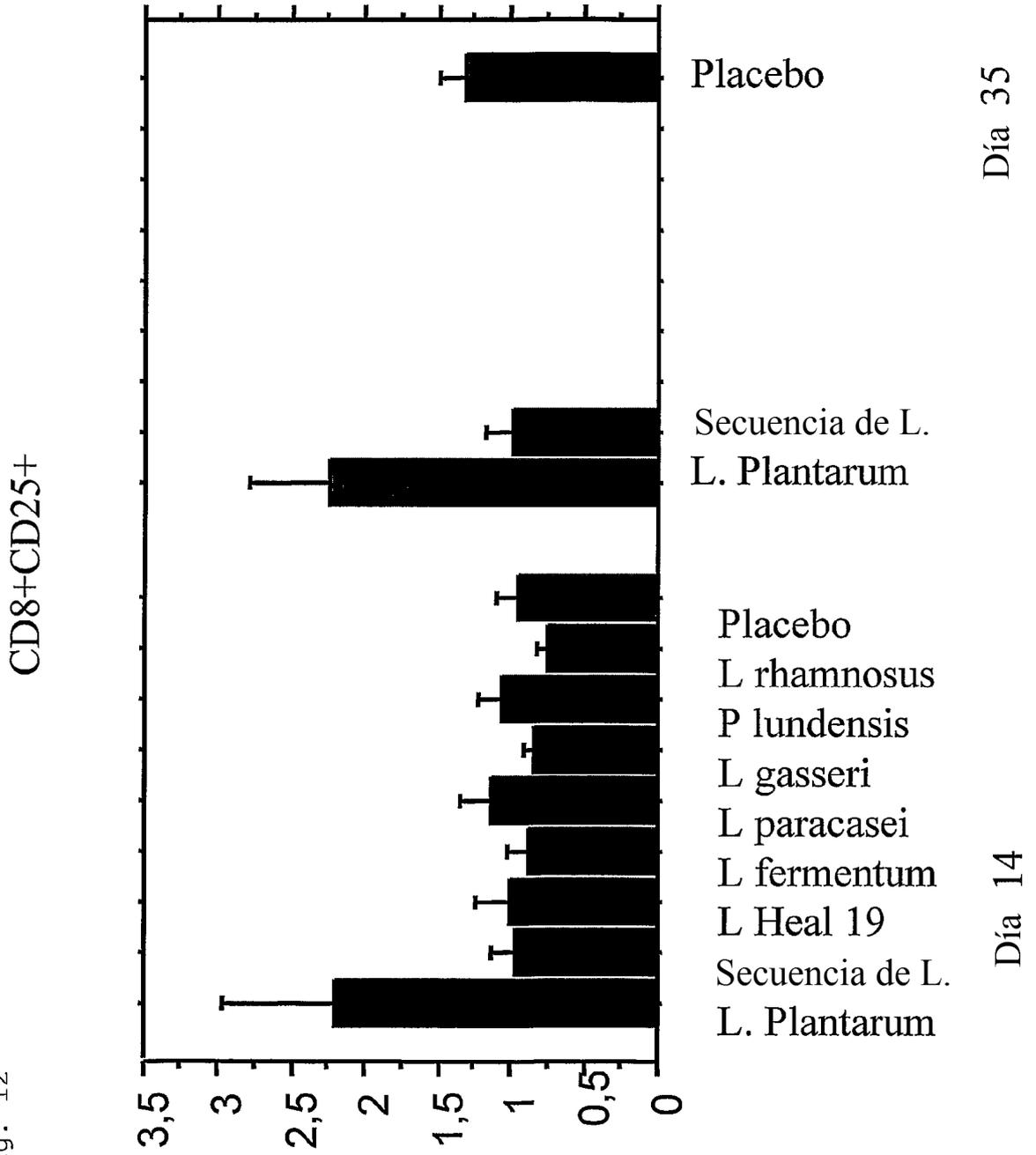
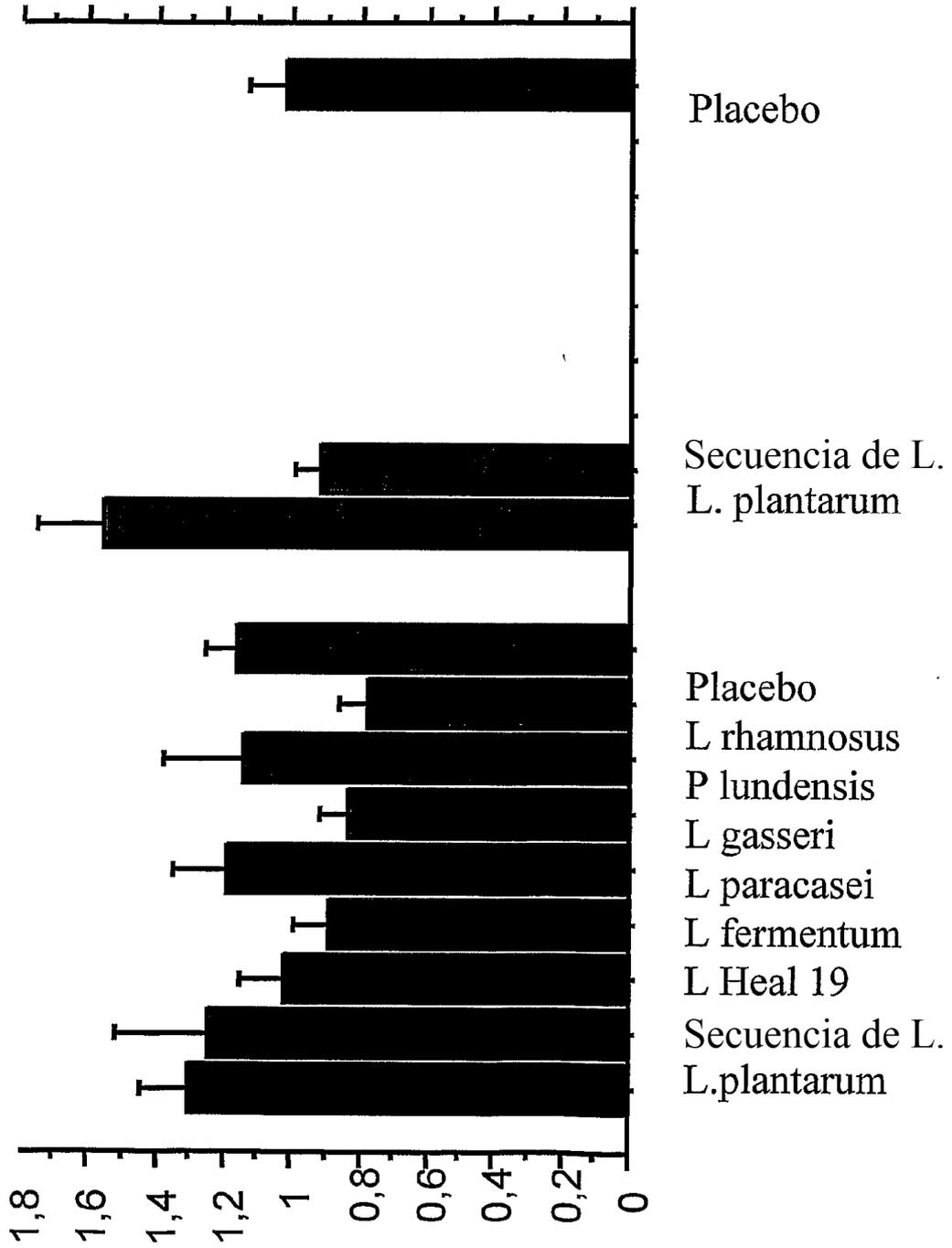


Fig. 12



CD4CD45RO

Fig. 13



Día 35

Día 14