

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 821**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/35** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2014 PCT/EP2014/057082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14166960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2014 E 14718542 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2983685**

54 Título: **Composición que comprende una asociación de un extracto de saúco y de una cepa de Lactobacillus rhamnosus**

30 Prioridad:

**09.04.2013 FR 1353193**

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

**07.05.2019**

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE MÉDICAMENT (100.0%)  
45, Place Abel Gance  
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es:

**LATGE, CHRISTIAN JACQUES y  
LIBON, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 711 821 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición que comprende una asociación de un extracto de saúco y de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*.

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende una asociación de un extracto de saúco y de por lo menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, destinada a estimular la inmunidad y/o a favorecer una respuesta anti-infecciosa y/o anti-inflamatoria.

10 El saúco o *Sambucus nigra L.* pertenece a la familia de las *Adoxaceae*. El género *Sambucus* comprende 25 especies distribuidas en todo el mundo en las regiones templadas. El saúco negro, *S. nigra ssp. nigra*, se cultiva ampliamente en Europa, en particular en Dinamarca, en Italia y en Austria, en la región norte de África y en la parte occidental de Asia. El saúco de Canadá, *S. nigra ssp. canadensis*, es originario del noreste de América del Norte y crece en Oregón, en Pensilvania y en Kansas, a pesar de una selección realizada en Canadá.

15 Los diferentes órganos del saúco: cortezas, raíces, tallo, flores, hojas y frutos se utilizan tradicionalmente en unos campos tan diversos como la medicina, la alimentación y la fabricación de herramientas y de juguetes. Las producciones industriales más importantes actualmente se refieren a la producción de extractos de bayas de saúco destinadas a los mercados nutracéuticos y a la industria de los colorantes.

20 Ciertas publicaciones tienen en cuenta el efecto de un extracto de bayas de saúco sobre la producción de citoquinas (Barak *et al.*, European Cytokine network, Vol 12(2), 290-296, 2001). Ya se ha demostrado el efecto de un extracto de saúco sobre la disminución de los síntomas relacionados con una infección gripal debida a virus Influenza (A y/o B y/o C), así como su efecto antiviral sobre los virus de tipo 1 del herpes simplex y el virus respiratorio sincitial (Zakay-Rones *et al.*, The Journal of International Medical Research, vol 32, 132-140, 2004).

25 Numerosos estudios científicos han demostrado los efectos benéficos sobre la salud de ciertos microorganismos presentes en alimentos fermentados, en particular productos lácteos. Estos microorganismos se denominan comúnmente "probióticos". Según la definición generalmente aceptada en la actualidad, los probióticos son: unos microorganismos vivos, que cuando se consumen en cantidades adecuadas, tienen un efecto benéfico sobre la salud del huésped (informe de la OMS sobre la evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluyendo la leche en polvo que contiene bacterias lácticas vivas, Córdoba, Argentina, 1-4 de octubre de 2001).

35 Se ha demostrado en las solicitudes de patente WO 96/20607, EP 0 794 707, EP 1 283 714 y FR 292 912 657 que el consumo de productos alimenticios que contienen bacterias probióticas puede producir unos efectos favorables en la salud, en particular por medio del reequilibrio de la flora intestinal, de la mejora de la resistencia a las infecciones, y de la modulación de la respuesta inmunitaria.

40 Los microorganismos probióticos utilizados en alimentación humana son generalmente unas bacterias lácticas, que pertenecen principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y en particular a la especie *Lactobacillus paracasei*.

45 *Lactobacillus* es un género de bacterias gram positivas, inmóviles, de formas y dimensiones variables, opcionalmente anaeróbicas. Se denomina así ya que la mayoría de sus miembros convierten la lactosa y otros azúcares simples en ácido láctico. En el ser humano, los lactobacilos son huéspedes muy extendidos como comensales y generalmente útiles, e incluso necesarios. Constituyen un elemento importante de la flora intestinal.

50 *Lactobacillus rhamnosus* es una bacteria que se consideró inicialmente como una subespecie de *Lactobacillus casei*, pero la investigación genética ha demostrado que era una especie distinta. *Lactobacillus rhamnosus* se encuentra normalmente en el estómago y en el tracto digestivo. Esta bacteria tiene propiedades que son benéficas para el tracto intestinal, pero también para el sistema inmunitario, en particular en la lucha contra los agentes patógenos de las vías intestinales y urinarias.

55 Los probióticos pueden ejercer efectos directos sobre el quimo, la flora, denominados como efectos luminales, o a nivel de los enterocitos o de las células inmunocompetentes del GALT, referidos entonces como efectos parietales. También pueden tener unos efectos indirectos asociados a las modificaciones del ecosistema o del sistema inmunitario local.

60 Ciertos probióticos tienen una capacidad de adherencia al epitelio digestivo. Esta propiedad puede constituir una ventaja ecológica que favorece las posibilidades de interrelaciones estrechas con el epitelio enterocitario y el sistema inmunitario local. Un estudio ha demostrado que una cepa adherente de *Lactobacillus rhamnosus* podría colonizar de manera prolongada la mucosa yeyunal y/o rectal en algunos sujetos (Alander *et al.*, Letters in Applied Microbiology, 24 (5), vol 361-364, 1997).

65

Unos estudios cada vez más numerosos demuestran unos efectos biológicos de múltiples cepas, es importante señalar que estos efectos parecen ser dependientes de la cepa.

La solicitud de patente US 2006/0233895 describe una composición que comprende un extracto de saúco que puede ser asociado eventualmente con un probiótico tal como el *Lactobacillus casei*. Sin embargo, esta composición contiene obligatoriamente una mezcla de *Uncaria Tomentosa*, de Pau d'Arco, de *Scutellaria Baicalensis* y de Artemisina. Por otra parte, esta composición no está destinada a estimular la inmunidad, sino que sirve para tratar la enfermedad de Lyme, que está causada por una infección bacteriana y que por lo tanto, es muy diferente de las infecciones por los virus del tipo influenza.

La solicitud de patente WO 2010/043696 divulga una composición que comprende una combinación de un extracto de saúco negro y de una cepa de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, o de *Streptococcus thermophilus* destinada a estimular la inmunidad. En esta solicitud, se demuestra una sinergia entre el saúco y el *Lactobacillus paracasei* para la producción de IL-10 y de interferón-gamma. Sin embargo, no se conoce el límite de la reacción inflamatoria. Unos datos sobre otras citoquinas y quimiocinas del tipo CXCL10 eliminarían el riesgo de un aumento demasiado importante de esta respuesta inflamatoria.

La presente invención está definida en las reivindicaciones y se refiere a una asociación sinérgica que comprende un extracto de saúco y por lo menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*.

La composición que comprende un extracto de saúco y por lo menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* puede comprender además unas vitaminas o unas sales minerales.

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

- preparación de la asociación;
- adición de la asociación en la composición según la presente invención.

En este caso, la asociación se prepara por lo tanto antes de su adición a la composición. Sin embargo también es posible preparar una composición mediante la adición de cada uno de los constituyentes de la asociación de una manera separada en la composición, es decir, sin preparar la asociación de antemano.

Preferentemente, la composición está destinada a la administración por vía oral.

Ventajosamente, la composición es un alimento, un complemento alimenticio, un medicamento o un producto OTC (Over The Counter).

Ventajosamente, el extracto de saúco se obtiene a partir de las bayas y/o flores de saúco, y preferentemente a partir de las bayas de saúco. De manera ventajosa, el extracto de saúco según la presente invención es un extracto hidrosoluble.

El extracto de saúco utilizado en el marco de la presente invención se puede caracterizar por su contenido, por una parte, en antocianos y por otra parte, en moléculas grandes tales como proteínas (en particular lectinas). Los antocianos son unos pigmentos naturales de las hojas, de los pétalos y de los frutos, situados en las vacuolas de las células, solubles en agua, que van del rojo anaranjado al azul púrpura en el espectro visible.

Ventajosamente, el extracto de saúco comprende antocianos, de una manera ventajosa, de la familia de las pelargonidinas y de las cianidinas, en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 25%, de una manera ventajosa entre aproximadamente 3% y aproximadamente 25% y de una manera aún más ventajosa entre aproximadamente 8% y aproximadamente 16% en peso, con respecto a la materia seca del extracto. Preferentemente, el contenido de antocianos es igual a aproximadamente 12% en peso, con respecto a la materia seca del extracto. Estos contenidos se expresan en cianidina-3-glucósido según el procedimiento HPLC descrito por Wu *et al.*, (J. Agric. Food Chem. 52(26), 7846-7856, 2004).

Ventajosamente, el extracto de saúco comprende proteínas en una cantidad comprendida entre 2 y 10% en peso, expresado con respecto a la materia seca (N x 6,25 según el procedimiento Kjeldahl: Protéines végétales, Coord. B. Godon, Collection Sciences et techniques agro-alimentaires, Technique et Documentation Lavoisier, París, 1985).

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

Las bayas de saúco frescas o congeladas se pueden someter a un prensado con el fin de obtener un jugo después de la filtración. Se puede someter a una etapa de hidrólisis enzimática (pectinasa o mezcla de pectina metilesterasa y poligalacturonasa) con el fin de aclararlo antes de la filtración (Girard y Fukumoto, Crit. Rev. Food

Sci. Nutr. 40(2), 91-157, 2000). También se puede realizar una extracción acuosa de las bayas secas y molidas, seguida de una separación sólido/líquido por filtración. Los extractos obtenidos de este modo se pueden utilizar tal cual o concentrados, o se pueden secar en forma de polvo. El contenido en antocianos, en esta etapa, está comprendido entre 0,5% y 3% en peso con respecto a la materia seca del extracto, y ventajosamente es igual a

5

El extracto de saúco se puede enriquecer, en particular en antocianos y/o en moléculas de alto peso molecular (proteínas, polifenoles, polisacáridos). Para ello, son posibles varios procedimientos bien conocidos por el experto en la materia:

10

- Ultrafiltración: etapa de diafiltración del jugo previamente diluido, y después sobreconcentración sobre membrana orgánica o mineral con un umbral de corte comprendido entre 1 y 20 kDa, y preferentemente comprendido entre 3 y 10 kDa (Girard y Fukumoto, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 40(2), 91-157, 2000).

15

- Paso sobre columna de resina polimérica absorbente de tipo Amberlite XAD.

15

- Extracción hidroalcohólica (mezcla en cualquier proporción de agua y de alcohol de C1 a C4) o soluciones acuosas a pH ácido (Bronnum-Hansen y Flink, Int. J. Food Sci. Tech. 21(2), 605-614, 1986; Lee y Wrolstad, J. Food Sci. 69(7), 564-573, 2004). Esta extracción se puede realizar ventajosamente directamente en las bayas secas y trituradas o en el puré realizado a partir de las bayas frescas.

20

El extracto así obtenido puede ser concentrado térmicamente (a una temperatura que no excede 50°C y al vacío) con el fin de aumentar los grados Brix y estabilizado de cara a contaminaciones microbiológicas. También se puede secar solo o sobre un soporte (por ejemplo maltodextrina, lactosa, etc.).

25

El jugo enriquecido obtenido se encuentra preferentemente entre 40 y 60° Brix, entre 3 y 25% de antocianos y entre 5 y 10% de proteínas (procedimiento Kjeldahl, N x 6,25) expresados en peso con respecto a la materia seca.

30

Ventajosamente, la cantidad de extracto seco de saúco por dosis unitaria presente en la composición, según la invención, está comprendida entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 1 g. Más ventajosamente, la composición comprende entre aproximadamente 20 mg y aproximadamente 200 mg de extracto seco de saúco por dosis unitaria y de una manera más ventajosa, entre aproximadamente 20 y 100 mg de extracto seco de saúco por dosis unitaria, y de manera aún más ventajosa entre 40 mg y 80 mg de extracto seco de saúco por dosis unitaria, y de otra manera ventajosa entre 20 y 60 mg de extracto seco de saúco por dosis unitaria.

35

En el marco de la presente invención, el término "dosis unitaria" representa la cantidad de composición según la invención administrada en una sola toma. Ventajosamente una dosis unitaria según la presente invención puede corresponder por ejemplo a un yogurt de 100 o 125 ml, a una cápsula de tamaño convencional o a un comprimido de 2 g. De esta manera, cualquiera que sea el peso de la composición, la cantidad de extracto seco de saúco y/o de cepa de *Lactobacillus rhamnosus* por dosis unitaria se mantiene constante.

40

Una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* muy particularmente conveniente en el marco de la presente invención es la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103). Esta cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es una cepa aislada en 1983 en el tracto intestinal en el ser humano de buena salud. Esta cepa constituye el objeto de la patente US nº 4.839.281. Se ha demostrado que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG es benéfica en la prevención de diferentes tipos de diarreas en el adulto y en el niño (Guandalini *et al.*, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30(1), 54-60, 2000; Osterlund *et al.*, Br. J. Cancer 97, 1028-1034, 2007). También se ha informado que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG era el origen de una reducción del riesgo de infecciones del tracto respiratorio en el niño (Hojsak *et al.*, Clin. Nutr. 29(3), 312-316, 2010).

50

*Lactobacillus rhamnosus* también es una ayuda considerable para el sistema inmunitario, en particular en la lucha contra los agentes patógenos de las vías intestinales y urinarias. *Lactobacillus rhamnosus* se fija a la mucosa del intestino, donde estimula el crecimiento de bacterias buenas que ayudan a la digestión. *Lactobacillus rhamnosus* es una bacteria que ayuda a eliminar y a prevenir el crecimiento de bacterias perjudiciales en los intestinos.

55

Ventajosamente, la composición comprenderá de  $1 \cdot 10^7$  a  $1 \cdot 10^{11}$  UFC de *Lactobacillus rhamnosus* por dosis unitaria, preferentemente de  $1 \cdot 10^8$  a  $1 \cdot 10^9$  UFC por dosis unitaria y de manera aún más preferida  $5 \cdot 10^8$  UFC por dosis unitaria.

60

En una forma de realización particular de la invención, la composición comprende, por dosis unitaria,

65

- de 10 mg a 1 g de extracto seco de saúco, preferentemente de 20 mg a 200 mg, ventajosamente de 20 mg a 100 mg y más preferentemente de 40 mg a 80 mg; y de otra manera ventajosa de 20 a 60 mg.

- de  $1.10^7$  a  $1.10^{11}$  de *Lactobacillus rhamnosus*, preferentemente de  $1.10^8$  a  $1.10^9$  UFC por dosis unitaria.

En una forma de realización particular de la invención, la composición comprende, por dosis unitaria,

- 5 - de 2 mg a 200 mg de antocianos de saúco, preferentemente de 2 mg a 100 mg y más preferentemente de 2 mg a 20 mg, y de manera ventajosa de 20 mg a 50 mg.
- de 2 mg a 100 mg de proteínas de saúco, preferentemente de 10 mg a 20 mg; y
- 10 - de  $1.10^7$  a  $1.10^{11}$  de *Lactobacillus rhamnosus*, preferentemente de  $1.10^8$  a  $1.10^9$  UFC por dosis unitaria.

De una manera ventajosa se observa entonces un efecto de sinergia.

- 15 La asociación de un extracto de saúco y una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la invención ha mostrado buenas capacidades para inducir y/o estimular una respuesta inmunitaria no específica demostrando así su interés en los campos alimentario y/o farmacéutico.

- 20 La composición puede presentarse ventajosamente en cualquier forma galénica utilizada normalmente en los campos alimentario y/o farmacéutico para una administración por vía oral o sublingual.

- 25 En el caso de un alimento, puede tratarse en particular de productos lácteos frescos, de productos lácteos fermentados, de yogures, de leches fermentadas, de leches infantiles, de polvos, de pastillas, de jugos vegetales, de bebidas y de sus mezclas, ventajosamente de entre el grupo constituido por productos lácteos frescos, jugos de frutas y/o vegetales o compotas de frutas.

- De manera ventajosa, la fruta se elige de entre el grupo constituido por manzana, naranja, frutas rojas, fresa, melocotón, albaricoque, ciruela, frambuesa, mora, grosella, limón, pomelo, plátano, piña, kiwi, pera, cereza, coco, fruta de la pasión, mango, higo, ruibarbo, melón, frutas exóticas, lichi, uvas, arándanos o sus mezclas.

- 30 Por "complemento alimenticio", se entiende en el sentido de la presente invención un producto alimenticio, cuyo objetivo es completar el régimen normal y que constituye una fuente concentrada de nutrientes o de otras sustancias que tienen un efecto nutricional o fisiológico solos o combinados.

- 35 Ventajosamente, el complemento alimenticio puede comprender vitaminas y/o minerales y/u oligoelementos.

- Entre estas vitaminas se pueden citar en particular las vitaminas A, C, D y E y las vitaminas del grupo B, en particular, B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9 y B12.

- 40 La vitamina A (retinol o carotenoides), la vitamina E y la vitamina C son las 3 vitaminas principales antioxidantes. La vitamina A está presente únicamente en los alimentos de origen animal. Sin embargo, ciertas plantas contienen provitaminas A, es decir, unas sustancias que el organismo es capaz de transformar en vitamina A. Es indispensable para la vista y para el crecimiento de los bronquios, de los intestinos o también de la piel. La vitamina A también participa en los mecanismos inmunitarios. Las sustancias antioxidantes se oponen a los efectos de los radicales libres moderando sus daños, restaurando las lesiones sufridas por las células, eliminando desechos, impidiendo el fenómeno de oxidación. Cuando los radicales libres se encuentran en exceso en el organismo, pueden favorecer el envejecimiento celular. Estas vitaminas antioxidantes tienen la capacidad de controlar la producción de radicales libres procedentes del metabolismo del oxígeno, y cuya sobreproducción es responsable de numerosos trastornos, en particular a nivel cardiovascular, inmunidad, cáncer, cutáneo, envejecimiento acelerado, enfermedades neurodegenerativas, etc. En particular, la vitamina C es un antioxidante bien conocido, soluble en agua. Los seres humanos dependen de fuentes externas de vitamina C para satisfacer sus necesidades de vitamina C. Así, el ácido ascórbico, el ascorbato de sodio, o su mezcla, son una fuente de vitamina C. La vitamina C es necesaria para la síntesis de los vasos sanguíneos y de los músculos. Favorece la absorción del hierro presente en los alimentos e interviene en varios mecanismos hormonales. También juega un papel en la eliminación de sustancias tóxicas. Una deficiencia de vitamina C puede disminuir la resistencia a las infecciones. La vitamina E también es un antioxidante bien conocido. La vitamina E puede funcionar en sinergia con la vitamina C con el fin de proteger la función celular vital contra los oxidantes normales. El acetato de alfa-tocoferol, el acetato de trimetil-tocoferil y/o el succinato de vitamina E son unas fuentes de vitamina E. La vitamina E tiene un efecto protector particularmente importante con respecto a las células del organismo. Desempeña un papel importante en los mecanismos de la procreación y participa en la síntesis de los glóbulos rojos.

- 60 La vitamina D se designa como una vitamina liposoluble, a pesar de ser ante todo una hormona sintetizada en el organismo humano a partir de un derivado del colesterol bajo la acción de los rayos UVB de la luz. Existe en 2 formas, D2 (ergocalciferol) o D3 (colecalciferol). Estas 2 moléculas son unos 9,10-secosteroides. La vitamina D participa en la absorción del calcio y del fósforo por los intestinos, así como en su reabsorción por los riñones, es una verdadera hormona. Por otra parte, influye más de 200 genes, lo cual explica su importancia insospechada

hasta hace poco en numerosas enfermedades tales como la artritis, los trastornos de la piel parecidos a la psoriasis, la diabetes, ciertos cánceres e incluso la demencia.

5 Las vitaminas B forman un grupo de vitaminas hidrosolubles que juegan un papel importante en el metabolismo de las células, entre las cuales se pueden encontrar:

- La vitamina B1 o tiamina, que es el cofactor del complejo piruvato descarboxilasa;
- La vitamina B2 o riboflavina, que es el precursor de la flavina adenina dinucleótido;
- 10 - La vitamina B3 (PP) o nicotinamida, que es el precursor de la nicotinamida adenina dinucleótido;
- La vitamina B5 o ácido pantoténico, que es el precursor y constituyente de la coenzima A;
- 15 - La vitamina B6 o piridoxina, que es la coenzima de las reacciones vinculadas al metabolismo de los aminoácidos y de las proteínas;
- La vitamina B8 (H) o biotina, que es la coenzima de las reacciones del metabolismo de los ácidos grasos, de los glúcidos y de los aminoácidos;
- 20 - La vitamina B9 o ácido fólico y la vitamina B12 o cianocobalamina, que son unos cofactores con la S-adenosilmetionina.

25 Las vitaminas B a menudo funcionan juntas en beneficio de la salud del cuerpo. Aumentan el metabolismo, ayudan a mantener una piel sana y unos músculos en buena salud, mejoran el sistema inmunitario, mejoran el sistema nervioso y retrasan los trastornos cognitivos de la enfermedad de Alzheimer, promueven el crecimiento de las células, así como sus divisiones, combaten los síntomas causados por un exceso de estrés.

30 Ventajosamente, los minerales se seleccionan de entre el hierro, el zinc, el selenio, el cromo, el manganeso, el molibdeno y sus mezclas. Las sales minerales son unas sustancias procedentes de rocas que entran en la composición de los organismos y que están presentes en la alimentación animal y vegetal. Vienen en forma iónica, se distinguen los elementos minerales principales, tales como el calcio, el hierro, el magnesio, el fósforo, el potasio, el sodio, el azufre y los oligoelementos tales como el aluminio, el arsénico, el boro, el cloro, el cromo, el cobalto, el cobre, el flúor, el yodo, el manganeso, el molibdeno, el níquel, el plomo, el silicio, el selenio, el vanadio, el zinc.

40 El hierro es una de las sales minerales esenciales para el correcto funcionamiento del organismo. Tiene un papel fundamental en la constitución de la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos, en la constitución de la mioglobina contenida en los músculos y en la de numerosas enzimas indispensables para el funcionamiento del organismo. Su carencia es frecuente en todo el mundo, se traduce por una anemia, acompañada por una reducción de la capacidad física e intelectual, por una disminución de la resistencia a las infecciones.

45 El zinc juega un papel antioxidante como cofactor de las enzimas que participan directamente en la defensa contra los oxidantes. El óxido de zinc, el gluconato de zinc, el citrato de zinc, el acetato de zinc, el cloruro de zinc, el lactato de zinc o el sulfato de zinc se pueden utilizar solos o en mezcla en las composiciones según la presente invención. Ventajosamente se trata del gluconato de zinc.

50 El selenio también juega un papel antioxidante como cofactor de las enzimas, en particular la glutatión peroxidasa, que participa directamente en la defensa contra los oxidantes.

El cromo es un oligoelemento que participa en el metabolismo de los glúcidos, favorece la acción de la insulina. También participa en el metabolismo de los lípidos y en el del colesterol, contribuye a disminuir su concentración. El cromo también juega su papel en el metabolismo de los ácidos nucleicos.

55 El manganeso es un oligoelemento indispensable para la eficacia de la vitamina B1. También interviene en ciertas metaloproteínas tales como la superóxido dismutasa. Actúa como cofactor de numerosas enzimas. También es un metal esencial para la síntesis de enzimas que participan en la lucha contra el estrés oxidativo y que previenen daños causados por los radicales libres.

60 El molibdeno participa en numerosos niveles como constituyente de ciertas enzimas, en particular la xantina oxidasa. Desempeña un papel en el crecimiento óseo y la estructura de los dientes. Tiene una acción favorable sobre el metabolismo del hierro. El molibdeno también participa en la desintoxicación del organismo y participa en la síntesis de ácido úrico.

65 Se pueden añadir unos principios activos opcionales adicionales según la invención. Por ejemplo, la coenzima Q10 y/o un extracto de Ginseng. La coenzima Q10 o ubiquinona es una sustancia similar a una vitamina que es

- vital para el funcionamiento del cuerpo humano. La coenzima Q10 está naturalmente presente en todas las células humanas y asegura la producción de la energía corporal en las mitocondrias. Aproximadamente el 95% de las necesidades corporales en energía son transformadas con ayuda de la coenzima Q10. Esta sustancia no puede ser sustituida por ninguna otra sustancia. Si se incrementa el aporte de coenzima Q10 mediante suplemento alimenticio, se refuerza la capacidad para el ejercicio. El metabolismo lipídico es más eficaz, así como el consumo máximo de oxígeno y la duración de esfuerzo. La reducción de la tasa de la coenzima Q10 está relacionada con el envejecimiento, pero también con el estrés.
- El ginseng es la planta medicinal más famosa en Asia. El ginseng es, sobre todo, un estimulante del sistema nervioso, físico e intelectual, e incrementa la resistencia física. Es un estimulante, vasomotor que tiene una acción de fondo sobre el organismo, permite una mejor resistencia a diversos estreses.
- La composición puede ser administrada por vía oral o cualquier otra vía de administración farmacéutica.
- Las composiciones pueden ser formuladas para la administración a los mamíferos, incluido el ser humano. Estas composiciones están realizadas de manera que puedan ser administradas por vía oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal. En este caso, los ingredientes activos pueden ser administrados en formas unitarias de administración, en mezcla con unos soportes farmacéuticos convencionales, a los animales o a los seres humanos.
- En el caso de un complemento alimenticio o de un medicamento, se pueden prever las siguientes formas galénicas: cápsulas, comprimidos para tragar, comprimidos para masticar, comprimidos efervescentes, pastillas, píldoras, polvos, gránulos, las soluciones o suspensiones orales y las formas de administración sublingual y bucal, las formas de administración subcutánea, tópica, intramuscular, intravenosa, intranasal o intraocular y las formas de administración rectal. La forma galénica preferida es la cápsula.
- Cuando se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, se mezclan los ingredientes activos con un vehículo farmacéutico tal como la gelatina, el almidón, la lactosa, el estearato de magnesio, el talco, la goma arábiga, la sílice o análogos. Es posible recubrir los comprimidos con sacarosa u otros materiales apropiados o también pueden ser tratados de tal manera que tengan una actividad prolongada o retardada y que liberen de manera continua una cantidad predeterminada de principio activo.
- Se obtiene una preparación en cápsulas mezclando los ingredientes activos con un diluyente (etapa facultativa) y vertiendo la mezcla obtenida en unas cápsulas blandas o duras.
- Una preparación en la forma de jarabe o de elixir puede contener los ingredientes activos junto con un edulcorante, un agente saborizante y un colorante apropiado.
- Los polvos o los gránulos dispersables en agua pueden contener los ingredientes activos mezclados con unos agentes de puesta en suspensión, así como unos correctores del sabor o unos edulcorantes.
- Para una administración rectal, se recurre a supositorios que se preparan con aglutinantes que se funden a la temperatura rectal, por ejemplo manteca de cacao o polietilenglicoles.
- Para una administración parenteral (intravenosa, intramuscular, etc.), intranasal o intraocular, se utilizan suspensiones acuosas, soluciones salinas isotónicas o soluciones estériles e inyectables que contienen agentes de dispersión y/o agentes humectantes farmacológicamente compatibles.
- Los ingredientes activos también se pueden formular en forma de microcápsulas, eventualmente con uno o varios soportes aditivos.
- Ventajosamente, la composición n está destinada a una administración por vía oral.
- La composición puede ser utilizada para estimular la inmunidad y/o reforzar las defensas inmunitarias y/o favorecer una respuesta anti-infecciosa y/o anti-inflamatoria y/o en el mantenimiento de la vitalidad.
- Se entiende que la utilización relativa al mantenimiento de la vitalidad se basa en alegaciones portadas por las vitaminas B2, B5, B6, B12, C y el hierro. Son alegaciones de salud autorizadas por la European Food Safety Authority (EFSA) sobre estos nutrientes. Se basan en datos científicos que miden los valores metabólicos de producción de energía a través de la utilización de los glúcidos, lípidos o prótidos. Esto también afecta a la síntesis de hormonas que actúan sobre el metabolismo, tales como las hormonas esteroideas.
- Por lo tanto, esta utilización está apoyada por las siguientes referencias:
- EFSA Journal 2009; 7(9): 1215 Scientific opinion on the substantiation of health claims related to iron and formation of red blood cells and haemoglobin (ID 249, ID 1589), function of the immune system (ID 252, ID

259), cognitive function (ID 253) and cell division (ID 368) pursuant to Article 13(1) of regulation (EC) n° 1924/2006.

- Huskisson E., Maggini S., Ruf M., Journal of International Medical Research 2007, 25: 277-289. The role of vitamins and minerals in energy metabolism and well-being.
- Institute of Medicine (1998), National Academy press, Washington, DC (592 pages). Dietary reference intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Bitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic acid, Biotin, and Choline. A report of the stanfing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes and its panel of folate, other B vitamins, and choline and subcommittee on upper reference levels of nutrients food and nutrition board institute of medicine.

Se describe asimismo la utilización de la composición en el tratamiento y/o la prevención de las infecciones respiratorias y/o intestinales.

Se describe asimismo la utilización en el tratamiento y/o la prevención de los síntomas provocados en particular por una infección por el virus de tipo 1 del herpes simplex, el virus respiratorio sincitial y los virus Influenza (A y/o B y/o C) y parainfluenza, ventajosamente los síntomas de los estados gripales, en particular provocados por los virus Influenza (A y/o B y/o C).

La composición es particularmente apropiada para el tratamiento y/o la prevención de los síntomas de los estados gripales provocados por una infección por virus Influenza (*Orthomyxovirus, Influenzae A, B o C*). Estos síntomas comprenden los resfriados, rinitis, tos, las inflamaciones de la mucosa nasal (rinorrea, obstrucción nasal, ataques de estornudos), dolor de garganta (diferentes manifestaciones: hormigueo, dificultad para tragar), fiebre, dolores de cabeza, dolores musculares, fatigas.

Estos "males de invierno" están asociados al debilitamiento de nuestras defensas inmunitarias.

Está prevista asimismo la utilización de la composición para la preparación de un alimento, de un complemento alimenticio o de un medicamento.

Está prevista asimismo la utilización de la composición para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de las infecciones respiratorias y/o intestinales.

Se describe asimismo la utilización de la composición para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de los síntomas de una infección por el virus de tipo 1 del herpes simplex, el virus respiratorio sincitial y los virus Influenza (A y/o B y/o C) y parainfluenza, ventajosamente los síntomas de los estados gripales, en particular provocados por los virus Influenza (A y/o B y/o C).

Otro objeto es la utilización de la composición para la preparación de un medicamento para su utilización para estimular la inmunidad y/o favorecer una respuesta anti-infecciosa y/o anti-inflamatoria y/o participar en el mantenimiento de la vitalidad.

Finalmente otro objeto es proporcionar un procedimiento de refuerzo de las defensas inmunitarias que consiste en una administración por vía oral de una composición a base de una asociación de un extracto de saúco y de por lo menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*.

La composición es apropiada para todas las edades de la vida. Está particularmente adaptada para los niños muy pequeños. Se entiende por "niños muy pequeños" en el sentido de la presente invención, un niño a partir de 6 meses y hasta 3 años de edad. La composición es conveniente en particular para "juniors", donde por "junior" se entiende, en el sentido de la presente invención, un niño a partir de 3 años hasta 17 años de edad. La composición también es particularmente apropiada para adultos, donde por "adulto" se entiende, en el sentido de la presente invención, a una persona de 18 años a 60 años de edad. Pero la composición también es particularmente apropiada para "personas mayores", donde por "persona mayor" se entiende en el sentido de la presente invención, una persona de por lo menos 60 años de edad.

La invención se podrá comprender mejor con la ayuda de los ejemplos no limitativos siguientes y que constituyen unas formas de realización particulares de las composiciones según la invención.

#### **Ejemplo 1: Preparación de un extracto de saúco utilizado dentro del marco de la presente invención**

El extracto de saúco se obtiene a partir del jugo de bayas de saúco enriquecido en antocianos y se seca sobre maltodextrina. El enriquecimiento se llevó a cabo mediante un procedimiento de filtración en membrana según el procedimiento siguiente: se diluyeron 26 litros de jugo de saúco clarificado con 284 litros de agua (11 volúmenes de agua por 1 volumen de jugo). Los 310 litros así obtenidos se agitaron y se calentaron a 45°C, luego se diafiltraron en una primera membrana de 5 kDa añadiendo 7 volúmenes de agua por volumen de jugo (es decir,

181 l). El permeado de diálisis se concentró a continuación por ultrafiltración sobre membrana de 5 kDa (membrana piloto de 5/10 kDa de superficie unitaria de 5.8 m<sup>2</sup>). El retentado de la ultrafiltración se concentró térmicamente bajo vacío a una temperatura no superior a 50°C, y luego se atomizó sobre un soporte de maltodextrina tal que la cantidad de maltodextrina fuera inferior o igual al 30% (p/p).

5

Las características del extracto así obtenido son:

- Contenido en antocianos: 10-14% en peso con respecto a la materia seca del extracto (expresado en cianidina-3-glucósido según el procedimiento HPLC descrito por Wu *et al.*, J. Agric. Food Chem. 52(26), 7846-7856, 2004).
- Contenido en proteínas: 5-7% en peso con respecto a la materia seca del extracto (N x 6,25 según el procedimiento Kjeldahl).

15 **Ejemplo 2: Complemento alimenticio en forma de cápsula, esta composición es particularmente adecuada para adultos.**

- Cepa probiótica liofilizada, *Lactobacillus rhamnosus*: 35 mg, es decir, 5·10<sup>8</sup> UFC;
- Extracto de saúco (*Sambucus nigra*) según el ejemplo 1: 50 mg;
- Vitamina A: 400 µg;
- Vitamina B1: 550 µg;
- Vitamina B2: 700 µg;
- Vitamina B5: 3 mg;
- Vitamina B6: 700 µg;
- Vitamina B8: 25 µg;
- Vitamina B9: 100 µg;
- Vitamina B12: 0,625 µg;
- Vitamina C: 40 mg;
- Vitamina D: 2,5 µg;
- Vitamina E: 6 mg;
- Hierro: 2,5 mg;
- Zinc: 2,5 mg;
- Selenio: 15 µg;
- Cromo: 12,5 µg;
- Manganeso: 500 µg;
- Molibdeno: 12,5 µg.

40 **Ejemplo 3: Suplemento alimenticio en forma de bolsita, esta composición es particularmente adecuada para niños muy pequeños.**

- Cepa probiótica liofilizada, *Lactobacillus rhamnosus*: 35 mg, es decir, 5·10<sup>8</sup> UFC;
- Extracto de saúco (*Sambucus nigra*) según el ejemplo 1: 25 mg;
- Vitamina C: 18 mg;
- Vitamina B6: 600 µg;
- Vitamina E: 2,4 mg;
- Zinc: 2,5 mg;
- Selenio: 15 µg.

50 **Ejemplo 4: Estudio *in vitro* de los efectos inmuno-moduladores combinados de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* con un extracto de saúco en células mononucleadas de la sangre periférica**

#### Material y método

55 Se aislaron unas células mononucleadas de la sangre periférica de sujetos sanos, se re-suspendieron y se distribuyeron en placas de 24 pocillos a razón de 5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo. Estas células se incubaron durante 18 h a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células se estimularon o bien con 10 µg/ml de lipopolisacárido, o bien en presencia de 100 µg/ml de extracto de saúco, es decir, con 5·10<sup>5</sup> *Lactobacillus rhamnosus*, o bien en presencia de 100 µg/ml de extracto de saúco y 5·10<sup>5</sup> *Lactobacillus rhamnosus*. Los sobrenadantes de cultivo se recuperaron para dosificar las diferentes citoquinas por citometría de flujo, se centrifugaron a 1600 rpm durante 10 minutos a 4°C y se conservaron a -20°C hasta la dosificación.

65 La dosificación de las citoquinas se llevó a cabo mediante la técnica de Luminex que se basa en el principio de la citometría de flujo. Esta tecnología Luminex se basa en el principio de la dosificación ELISA sobre microplacas de 96 pocillos con, como soporte, unas microbolas que incorporan dos fluorocromos según una relación precisa, lo cual les confiere un código de color que las identifica (fluorescencias diferentes). El sistema óptico del citómetro (Bio-Plex 200) está constituido por dos láseres: un láser rojo (λ = 635 nm) excita en cada microbola la

mezcla de colorantes que la define, e identifica así la citoquina a dosificar. El segundo láser verde, ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ) excita el fluorocromo reportero unido al anticuerpo específico de detección con el fin de cuantificar la citoquina. El sistema está gestionado por un ordenador equipado con un software de adquisición y de análisis de los datos (Bio-Plex Manager versión 4.1). Después de la descongelación, los sobrenadantes se ensayaron puros y después diluidos hasta  $1/20^{\text{a}}$  en medio de cultivo, gracias a un kit de Milliplex (Millipore, referencia HCYTOMAG-60K-29). Este comprende las bolas específicas, los anticuerpos de detección y los estándares para dosificar las citoquinas siguientes: IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL8, CXCL10, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF.

La concentración de cada citoquina se expresa en pg/ml, se ha promediado a partir de los valores obtenidos por 6 donantes. El umbral de detección de cada citoquina es de 3,2 pg/ml. Para las muestras bajo el umbral de detección, se ha atribuido un valor arbitrario correspondiente al umbral de detección  $\times \frac{1}{2}$ , es decir, 1,6 pg/ml. El análisis estadístico comparó el  $\log_{10}$  de la concentración de cada citoquina mediante ANOVA.

### 15 Resultados

Las concentraciones obtenidas para cada condición de estimulación por citoquina se agrupan en las tablas 1 y 2. Para que haya sinergia a nivel de una citoquina, es preciso que:

- 20 - la concentración de citoquina obtenida experimentalmente estimulando las células mononucleadas de la sangre periférica simultáneamente con el probiótico y el extracto de saúco, sea superior la suma de las concentraciones de citoquina observada individualmente con el saúco y con el probiótico;
- 25 - la concentración media de citoquina obtenida con la asociación para los 6 donantes es significativamente superior al mismo tiempo a la obtenida con el saúco como y a la obtenida con el probiótico.

En la tabla 1 se resumen los resultados de la actividad del extracto de saúco asociado con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y la contribución de cada uno de los activos en la producción de citoquinas por unas células mononucleadas de sangre periférica humanas.

30

Tabla 1

Citoquinas	Efecto saúco	Efecto <i>L. rhamnosus</i>	Efecto <i>L. rhamnosus</i> + saúco	Sinergia
IL-1 $\beta$	+/-	+	++	No
IL-1RA	+	+	++++	Sí
IL-2	-	-	-	No
IL-4	+	-	+	No
IL-5	-	-	-	No
IL-6	+	++	++++	Sí
IL-9	-	-	-	No
IL-10	+/-	+	++++	Sí
IL-12p70	-	+	+	No
IL-13	-	-	-	No
IL-15	-	-	-	No
IL-17A	-	-	-	No
CCL2	++	+++	+++	No
CCL3	++	+++	++++	Sí
CCL4	++	+++	++++	Sí
CCL5	-	-	-	No
CCL22	+/-	+	++	No
CXCL8	++	+++	++++	Sí
CXCL10	↓	++	+	No
TNF $\alpha$	+	++		No
IFN $\gamma$	-	+	+	No
GM-CSF	-	+	++++	Sí

Un aumento de IL-1 $\beta$  en respuesta al saúco sólo se observa en 2 de los 6 donantes probados. El probiótico desencadena la producción de IL-1 $\beta$  en 5/6 de los donantes. La asociación de saúco y probiótico aumenta la producción de IL-1 $\beta$ , pero no alcanza significatividad estadística.

Todos los donantes probados producen IL-1RA (antagonista al receptor de IL-1) en respuesta al saúco, lo cual sugiere la actividad anti-inflamatoria del saúco. Todos los donantes probados producen IL-1RA en respuesta a *Lactobacillus rhamnosus*. La concentración de IL-1RA obtenida con la asociación saúco probiótico para los 6 donantes es significativamente superior al mismo tiempo al saúco y al probiótico. Además, la concentración de IL-1RA obtenida con la asociación saúco probiótico es superior la suma de la obtenida por el probiótico y a la

obtenida por el saúco, por lo tanto, existe sinergia de los 2 activos para la producción de IL-1RA.

Un aumento de IL-2 en respuesta al saúco solamente se observa para uno solo de los 6 donantes probados. Tres de los 6 donantes responden al probiótico por una producción moderada de IL-2. La asociación de los 2 activos no tiene ningún impacto sobre la producción de IL-2.

Ninguno de los donantes probados responde al saúco por una producción de IL-5. De la misma manera, ninguno de los donantes probados responde al probiótico por una producción de IL-5. La asociación de los 2 activos no tiene ningún impacto sobre la producción de IL-5.

Todos los donantes probados producen IL-6 en respuesta al saúco. Cinco de los 6 donantes responden al probiótico, se debe observar que el que no responde tiene la tasa basal más alta de IL-6. Para los que responden, el probiótico es un inductor más potente de IL-6 que el saúco. La asociación de los 2 activos provoca una producción sinérgica de IL-6.

La Tabla 2 muestra un ejemplo de los resultados de la actividad del extracto de saúco asociado con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y la contribución de cada uno de los activos en la producción de IL-6 mediante unas células mononucleadas de la sangre periférica humana obtenidos en los 6 donantes.

Tabla 2

Grupos	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6
Control	1,6	1,6	7	1,6	69	4
Prob	148	301	968	362	51	1148
Saúco	17	27	44	12	405	17
Prob + saúco	1258	1426	5398	1721	6081	5369

Prob: probiótico, *Lactobacillus rhamnosus*

Ninguno de los donantes probados responde al saúco mediante una producción de IL-9. Del mismo modo, ninguno de los donantes probados responde al probiótico mediante una producción de IL-9. La asociación de los 2 activos no tiene ningún impacto en la producción de IL-9.

Cuatro de los 6 donantes probados producen IL-10 en respuesta al saúco. Todos los donantes probados producen IL-10 en respuesta al probiótico. La concentración de IL-10 obtenida con saúco + el probiótico para los 6 donantes es significativamente superior a la vez a la obtenida con el saúco y a la obtenida con el probiótico. Además, la concentración de IL-10 obtenida con la asociación saúco probiótico es superior a la suma de la obtenida con el probiótico y la obtenida por el saúco, por lo tanto, hay sinergia de los 2 activos para la producción de IL-10.

Ninguno de los donantes probados responde al saúco mediante una producción de IL-12p70. Por el contrario, todos los donantes producen IL-12p70 en respuesta al probiótico. La asociación del saúco y del probiótico no potencia la producción de IL-12p70.

Ninguno de los donantes probados responde al saúco mediante una producción de IL-15. Del mismo modo, ninguno de los donantes probados responde al probiótico mediante la producción de IL-15. La asociación de los 2 activos no tiene ningún impacto sobre la producción de IL-15.

Ninguno de los donantes probados responde al saúco mediante una producción de IL-17A. Ocurre lo mismo para la respuesta al probiótico: no induce la producción de IL-17A en ninguno de los donantes. La asociación de los 2 activos no tiene ningún impacto sobre la producción de IL-17A.

Todos los donantes probados responden al saúco mediante una producción de CCL2. Cinco de los 6 donantes responden al probiótico, se debe observar que el que no responde tiene la tasa basal más alta de CCL2, el probiótico desencadena una respuesta más fuerte que el saúco. La asociación de los 2 activos estimula una elevada secreción de CC12 significativamente superior al saúco pero no al probiótico.

Todos los donantes probados responden al saúco mediante una producción de CCL3. Cinco de los 6 donantes responden al probiótico, se debe observar que el que no responde tiene la tasa basal más alta de CCL3, el probiótico desencadena una respuesta más fuerte que el saúco. La concentración de CCL3 obtenida con el saúco + el probiótico para los 6 donantes es significativamente superior a la vez a la obtenida con el saúco y a la obtenida con el probiótico. Además, la concentración de CCL3 obtenida con la asociación saúco probiótico es superior a la suma de la obtenida por el probiótico y la obtenida por el saúco, por lo tanto hay sinergia de los 2 activos para la producción de CCL3.

Todos los donantes probados responden al saúco mediante la producción de CCL4. Todos los donantes

5 probados producen CCL4 en respuesta al probiótico, a excepción de un donante que tiene una alta tasa basal de CCL4, el probiótico desencadena una respuesta más fuerte que la del saúco. La concentración de CCL4 obtenida con el saúco + el probiótico para los 6 donantes es significativamente superior a la vez a la obtenida con el saúco y a la obtenida con el probiótico. Además, la concentración de CCL4 obtenida con la asociación saúco probiótico es superior a la suma de la obtenida por el probiótico y la obtenida por el saúco, por lo tanto hay sinergia de los 2 activos para la producción de CCL4.

10 Ninguno de los donantes probados responde al saúco mediante una producción de CCL5. Solo uno de los 6 donantes produce CCL5 en respuesta al probiótico. La asociación del saúco y del probiótico no tiene ninguna acción sobre CCL5.

15 Sólo 2 de los 6 donantes probados producen CCL22 en respuesta al saúco. Todos los donantes probados producen CCL22 en respuesta al probiótico. La asociación de los 2 activos no tiene ninguna acción sinérgica sobre CCL22.

20 Todos los donantes probados producen CXCL8 en respuesta al saúco. Cinco de los 6 donantes responden al probiótico, se debe observar que el que no responde tiene la tasa basal más alta de CXCL8, el probiótico desencadena una respuesta más fuerte que el saúco. La asociación de los 2 activos provoca una producción sinérgica de CXCL8.

25 Ninguno de los donantes probados produce CXCL10 en respuesta al saúco, a la inversa el saúco inhibe significativamente la producción constitutiva de CXCL10. Cinco de los 6 donantes responden al probiótico. La asociación de los 2 activos muestra que el saúco inhibe significativamente la producción inducida por el probiótico.

30 Todos los donantes probados producen TNF $\alpha$  en respuesta al saúco. Todos los donantes probados producen TNF $\alpha$  en respuesta al probiótico. Esta producción es más intensa que la desencadenada por el saúco. La asociación del saúco y del probiótico no tiene ningún impacto sobre la producción de TNF $\alpha$ .

35 Ninguno de los donantes probados produce IFN $\gamma$  en respuesta al saúco, por otra parte, todos los donantes probados producen IFN $\gamma$  en respuesta al probiótico. La asociación del saúco y del probiótico no tiene ningún impacto sobre la producción de IFN $\gamma$ .

40 Ninguno de los donantes probados produce GM-CSF en respuesta al saúco. Por el contrario, 5 de los 6 donantes producen GM-CSF en respuesta al probiótico. La concentración de GM-CSF obtenida con el saúco + el probiótico para los 6 donantes es significativamente superior a la vez a la obtenida con el saúco y a la obtenida con el probiótico. Además, la concentración de GM-CSF obtenida con la asociación saúco probiótico es superior a la suma de la obtenida por el probiótico y la obtenida por el saúco, por lo tanto hay sinergia de los 2 activos para la producción de GM-CSF.

45 La falta de producción de IL-2, IL-5 e IL-9, de las citoquinas que estimulan la proliferación de las células T, sugiere que la asociación no debería activar la expansión clonal de los linfocitos T.

50 La producción de IFN $\gamma$  y de IL-12p70, típicas de una respuesta de tipo 1, se deben a *Lactobacillus rhamnosus*, mientras que la modesta producción de IL-4, característica de una respuesta de tipo 2, está relacionada con el extracto de saúco. El tipo de respuesta se estima por la relación IFN $\gamma$ /IL-4: la respuesta es de tipo 1 para una relación superior a 100, de tipo 0 cuando esta relación está comprendida entre 0,01 y 100 y de tipo 2 si es inferior a 0,01. Esta relación es de 600 para *Lactobacillus rhamnosus*, 3 para el extracto saúco y 119 para la asociación de saúco + *Lactobacillus rhamnosus*, que por lo tanto es de tipo 1. Por lo tanto, la fuerte respuesta de tipo 1 inducida por el probiótico está bien compensada por la producción de IL-4 desencadenada por el saúco.

55 Las producciones de IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL8, TNF $\alpha$  y GM-CSF por la asociación saúco y *Lactobacillus rhamnosus* sugieren una actividad inflamatoria con reclutamiento y activación de células en el sitio de la inflamación. Dado que las quimiocinas implicadas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL8), habrá atracción preferentemente de células de la inmunidad innata, tipo polinucleares y monocitos/macrófagos, pero también de linfocitos. Esta actividad pro-inflamatoria será modulada por la producción de IL-1RA, citoquina anti-inflamatoria que se une al mismo receptor membranario que IL-1, evitando ésta enviar su señal a la célula. Además, el efecto inhibidor del saúco sobre las producciones constitutivas e inducidas de CXCL10, quimioquina que atrae a los linfocitos activados, las células NK, pero también los eosinófilos, va en el mismo sentido. Por lo tanto, la actividad proinflamatoria del probiótico parece ser contrarrestada por el efecto anti-inflamatorio del saúco.

### Conclusiones

65 Bajo las condiciones ensayadas, los inventores han demostrado que la asociación de un extracto de saúco y de *Lactobacillus rhamnosus* sinergiza en lo que respecta a la inducción de IL-1RA, de IL-6, de IL-10, CCL3, CCL4,

- 5 CXCL8, GM-CSF. Esta asociación induce la producción de IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL8, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y GM-CSF. Este perfil sugiere que la asociación saúco + *Lactobacillus rhamnosus* estimula las defensas inmunitarias reclutando monocitos, polinucleares y linfocitos en el sitio inflamatorio. El perfil de tipo 1 favorecerá entonces el desarrollo de respuestas de tipo celular, en particular con activación de los monocitos/macrófagos y neutrófilos, pero sin efecto linfoproliferativo. La reacción inflamatoria será contenida por la producción de IL-1RA y de IL-10, y por la inhibición de la producción de CXCL10, relacionada específicamente al saúco.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende una asociación sinérgica de un extracto de saúco y de por lo menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, comprendiendo dicho extracto de saúco un contenido en antocianos comprendido entre 0,5 y 25% en peso con respecto a la materia seca del extracto y un contenido en proteínas comprendido entre 2 y 10% en peso con respecto a la materia seca del extracto, para su utilización para estimular la inmunidad y/o reforzar las defensas inmunitarias.
- 10 2. Composición que comprende una asociación sinérgica de un extracto de saúco y de por lo menos una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, comprendiendo dicho extracto de saúco un contenido en antocianos comprendido entre 0,5 y 25% en peso con respecto a la materia seca del extracto y un contenido en proteínas comprendido entre 2 y 10% en peso con respecto a la materia seca del extracto, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de los síntomas de los estados gripales.
- 15 3. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que comprende una cantidad de *Lactobacillus rhamnosus* comprendida entre  $1 \cdot 10^7$  y  $1 \cdot 10^{11}$  UFC/dosis unitaria.
- 20 4. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que se trata de un complemento alimenticio o de un medicamento.
- 25 5. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que se trata de un complemento alimenticio en una forma galénica seleccionada de entre el grupo constituido por las cápsulas, los comprimidos para tragar, los comprimidos para masticar, los comprimidos efervescentes, las pastillas, los polvos, los gránulos, las soluciones o suspensiones orales y las formas de administración sublingual y bucal.
- 30 6. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que comprende entre 20 mg y 200 mg de extracto seco de saúco por dosis unitaria, preferentemente entre 20 mg y 100 mg de extracto seco de saúco por dosis unitaria, y entre  $1 \cdot 10^7$  y  $1 \cdot 10^{11}$  UFC de *Lactobacillus rhamnosus* por dosis unitaria, preferentemente entre  $1 \cdot 10^8$  y  $1 \cdot 10^9$  UFC de *Lactobacillus rhamnosus* por dosis unitaria.
7. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que comprende además unas vitaminas y/o unas sales minerales.