



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 020**

51 Int. Cl.:

A23K 1/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

A23L 1/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02783892 .9**

96 Fecha de presentación : **18.10.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1567018**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2005**

54

Título: **Procedimiento para potenciar la función inmunitaria en mamíferos usando cepas de *Lactobacillus reuteri*.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.11.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.11.2009

73

Titular/es: **BIOGAIA AB.**
Tegnérgatan 15, Box 3242
103 64 Stockholm, SE

72

Inventor/es: **Kang, Ho-Jin;**
Kwon, Ik-Boo;
Connolly, Eamonn;
Möllstam, Bo y
Lee, Dong-Seog

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 329 020 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

Procedimiento para potenciar la función inmunitaria en mamíferos usando cepas de *Lactobacillus reuteri*.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención versa acerca del uso de la cepa ATCC55730 del *Lactobacillus reuteri* como agente potenciador inmunitario.

Descripción de la técnica relacionada

Se han formulado probióticos que contienen una amplia variedad de distintos microorganismos gastrointestinales, fundamentalmente debido al aumento de los patógenos resistentes a los antibióticos. Se han usado cepas de una amplia variedad de especies de *Lactobacillus*, incluyendo el *L. reuteri*, en formulaciones probióticas. El *Lactobacillus reuteri* es uno de los habitantes que se dan de forma natural en el tracto gastrointestinal de los animales, y se encuentra de forma rutinaria en los intestinos de animales sanos. Se sabe que posee actividad antibacteriana. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. Nos 5.439.678, 5.458.875, 5.534.253, 5.837.238 y 5.849.289. Cuando se cultivan células de *L. reuteri* bajo condiciones anaerobias en presencia de glicerol, producen la sustancia antimicrobiana denominada reuterina (β -hidroxi-propionaldehído).

Con el *L. reuteri* también se ha asociado una actividad inmunomoduladora. Véase, por ejemplo, "Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice", de Wagner RD, *et al*, Infect Immune 1997 Oct 65:4165-72; sin embargo, existen diferencias de eficacia entre cepas y se precisan procedimientos para seleccionar las cepas más efectivas, por ejemplo el procedimiento que selecciona cepas reclutando células CD4+, proporcionado en la presente invención.

El documento WO-A-9 400 139 revela un procedimiento para estimular el sistema inmunitario de aves de corral.

Además, aunque se sabe que el *L. reuteri* se utiliza como un probiótico que aporta beneficios generales, la investigación anterior solo se ha percatado hasta cierto extremo de la importancia de utilizar las mejores cepas de *Lactobacillus* que neutralizan las toxinas producidas por los patógenos ya presentes en el tracto gastrointestinal. Véase, por ejemplo, "Removal of common Fusarium toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*", de El-Nezami HS, *et al*, Food Addit Contam 2002 Jul 19: 680-6. De tal neutralización de toxinas, que incluye el enlace, no solo hay informes de que es importante para mejorar los efectos directos causados por estos patógenos productores de toxinas, sino también para reducir la carga general del sistema inmunitario, conforme a la presente invención.

Existen muchas causas diferentes de problemas gastrointestinales causados por microorganismos patógenos. Por ejemplo, la *Helicobacter pylori* causa úlceras gástricas y duodenales, cáncer gástrico y linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica. Ciertas cepas patógenas de *Escherichia coli* producen toxinas como la toxina Vero (VT), producida por la *E. coli* O157:H7, contra la cual los antibióticos son cada vez menos efectivos.

Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar un procedimiento para potenciar la función inmunitaria en mamíferos usando cepas de *Lactobacillus reuteri* que se ha detectado que son efectivas tanto en el reclutamiento de células CD4+ como en la neutralización de toxinas, proporcionar procedimientos para seleccionar tales cepas de *L. reuteri* potenciadoras del sistema inmunológico, y proporcionar productos que contienen tales cepas. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para utilizar sobrenadantes de cultivos de cepas de *L. reuteri* efectivos para reducir la carga inmunitaria de estas toxinas.

50 **Resumen de la invención**

La presente invención versa acerca del uso de la cepa ATCC55730 del *Lactobacillus reuteri* como agente potenciador inmunitario, y con procedimientos para potenciar la función inmunitaria en mamíferos usando cepas de *Lactobacillus reuteri* en productos que contienen células de tales cepas. Esta cepa muestra un buen enlace con toxinas y buena neutralización de las mismas; y muestra buen reclutamiento de CD4+. Otros objetos y otras características de las invenciones serán más plenamente evidentes a partir de la siguiente revelación y de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

60 Figura 1. Confirmación de la capacidad inhibidora contra el enlace de la citotoxina Vero (VT) y el receptor Gb₃ en un sobrenadante de un cultivo de *L. reuteri* mediante ELISA competitiva. Cada uno reaccionó como sigue, en placas recubiertas con Gb₃, seguido por la realización de ELISA usando acm contra VT.

Control: VT + caldo de soja trípico (CST)

65 VT + G: VT + 250 mM de solución de glicerol

VT + LRS: VT + un sobrenadante de un cultivo de *L. reuteri* incubado en solución de 250 mM de glicerol

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

La presente invención versa acerca del uso de la cepa ATCC55730 del *Lactobacillus reuteri*, que exhibe un buen enlace con toxinas y un buen efecto neutralizador de las mismas; y exhibe buen reclutamiento de células CD4+ para la producción de una composición para potenciar la función inmunitaria en mamíferos. También versa acerca del uso de tal cepa de *Lactobacillus reuteri* en productos y con un procedimiento para potenciar la función inmunitaria en mamíferos usando tal cepa de *Lactobacillus reuteri*.

Las citoquinas son proteínas del sistema inmunitario que son modificadores de la respuesta biológica. Coordinan las interacciones del sistema inmunitario de los anticuerpos y las células T y amplifican la reactividad inmunitaria (10). Las citoquinas incluyen monoquinas sintetizadas por macrófagos y linfoquinas producidas por linfocitos T activados y células asesinas naturales (NK). El subconjunto CD4+, tanto en seres humanos como en ratones, se basa en la producción de citoquinas y en las funciones efectoras. Las células Th1 sintetizan interferón gamma (INF- γ), IL-2 y factor de necrosis tumoral (FNT). Son fundamentalmente responsables de la inmunidad celular contra los microorganismos intracelulares y de las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado. Afectan a la síntesis de inmunoglobulina G 2a (IgG2a) y a la citotoxicidad celular mediada dependiente de anticuerpos. El INF- γ que producen activa los macrófagos y, en consecuencia, la fagocitosis. Las células Th2 sintetizan interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13). Inducen las respuestas de los anticuerpos IgE e Ig G1, y la inmunidad de las mucosas por síntesis de mastocitos y desarrollo de eosinófilos y factores de diferenciación, y facilitación de la síntesis de IgA.

Incluidos en la invención hay procedimientos con diversos pasos ejemplares que confirman: la administración de la cepa de *L. reuteri*, el análisis de la cepa y la eficacia de la cepa usada tanto en el reclutamiento de células CD+4 como en la neutralización de toxinas. Los datos indican que, por ejemplo, una formulación para tabletas que contiene *L. reuteri* da niveles de colonización gastrointestinal similares a los producidos con la administración directa de cultivos celulares. La colonización con *L. reuteri* está relacionada con la ingestión de *L. reuteri*, y el periodo de lavado (el tiempo que tardan los niveles de *L. reuteri* en descender a los niveles previos a la ingestión) es de al menos 28 días tras la administración de la tableta, lo que muestra que la invención del presente documento es aplicable para cultivos celulares de *L. reuteri*, al igual que para productos formulados para que contengan tales cultivos de *L. reuteri*.

Preferentemente, la invención versa acerca del uso de productos que comprenden cepas de *L. reuteri*, como probiótico para la mejora profiláctica de la función inmunitaria en mamíferos. Tales productos pueden ser diversos productos alimenticios, como un suplemento dietético, productos de confitería o tabletas que contienen células de la cepa seleccionada.

Las cepas de *L. reuteri* conforme a la invención pueden ser usadas también para la preparación de un fármaco para el tratamiento de diversos microorganismos que producen toxinas, como *Escherichia coli*. Así pueden tratarse el *E. coli* enterohemorrágico y las toxinas VT.

Conforme a la invención, tanto las células de cepas de *L. reuteri* como un supernadante de un cultivo de las mismas pueden usarse para la producción de una composición profiláctica de tipo probiótico y farmacéutica.

Conforme a la invención, puede usarse cualquier cepa de *L. reuteri* que exhiba buen reclutamiento de células CD4+ y/o buen enlace con toxinas. Que estén presentes células CD4+ puede analizarse usando anticuerpos contra CD4, por ejemplo con procedimientos inmunohistoquímicos (como en el ejemplo 5) o inmunofluorescentes. En enlace con toxinas puede confirmarse poniendo en contacto células o sobrenadante de *L. reuteri* con toxinas y haciendo ensayos para encontrar la diferencia en toxinas disponibles, como se hace, por ejemplo en el ejemplo 1.

Los productos probióticos, profilácticos y farmacéuticos conforme a la invención pueden comprender aditivos y excipientes aceptables para su uso nutricional o farmacéutico.

Las características de la presente invención serán entendidas más fácilmente con referencias a los siguientes ejemplos, que no han de interpretarse como si limitasen la invención.

Ejemplo 1*Estudio de la toxina Vero*

En este experimento se emplearon cepas de tres bacterias del ácido láctico: *L. reuteri* ATCC 55730; *L. bulgaricus*, cepa LBS12 (CHR, Horsholm, Dinamarca); y *L. casei*, cepa 0 1, (CHR, Horsholm, Dinamarca). Se incubó *L. reuteri* en una condición de fijación aerotrópica a 37°C durante 24-48 horas después de inocular caldo MRS (más 20 mM de glucosa). En algunos casos, esta incubación inicial fue seguida por centrifugación a 2.500 rpm durante 30 minutos, lavando con tampón fosfato salino (TFS) dos veces para eliminar componentes del medio, suspensión en una solución de glicerol de 250 mM, seguida por incubación en una condición de fijación aerotrópica a 37°C durante 24-48 horas. Se empleó cada bacteria del ácido láctico de la prueba siguiendo al ajuste a 2 g/30 ml (peso en seco), a la centrifugación a 2.500 rpm durante 30 minutos tras la incubación, a la recuperación del sobrenadante, al ajuste del pH a 7,0 con NaOH para inocular células Vero (véase más abajo) y a la filtración mediante un filtro de 2,0 μ m. Sirvieron de control una solución de glicerol y caldo MRS ajustados a un pH de 7,0, siguiendo a su filtración por un filtro de 2,0 μ m.

ES 2 329 020 T3

Se incubaron células Vero (células renales del cercopiteco verde africano, ATCC - CCL81) en un medio esencial mínimo (MEM, Sigma) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma) at 25 g/ml de gentamicina (Sigma) a 37°C en una incubadora de CO₂ al 10% durante 48 horas, y se usaron después de confirmar la formación de monocapas.

5

Se empleó *Escherichia coli* 0157:H7 (ATCC 43894), que segrega tanto VT1 como VT2, siguiendo a la inoculación en caldo de soja triptico (CST), a la incubación durante 24 horas mientras se remueve en una incubadora agitadora a 37°C, a la centrifugación a 2.500 rpm durante 30 minutos, y al filtrado del sobrenadante del cultivo.

10 Fueron inoculadas 500 células Vero (2×10^5 células/ml) a una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 10% durante 48 horas para confirmar la formación de una monocapa, seguido por la realización del experimento usando los siguientes tratamientos: A: VT únicamente (control positivo); B: CST (medio de cultivo de *Escherichia coli* 0157:H7); C: caldo MRS (bacterias de ácido láctico de ensayo); D: solución de glicerol (medio de cultivo de *L. reuteri*); E: VT + caldo MRS; F: VT + solución de glicerol; G: VT + sobrenadante del cultivo de *L. reuteri* en la solución de glicerol; H: VT + sobrenadante del cultivo de *L. bulgaricus* en el caldo MRS; I: VT + sobrenadante del cultivo de *L. bulgaricus*; y J: VT + sobrenadante del cultivo de *L. casei*. Los tratamientos B, C y D son para determinar si cada fluido de cultivo por sí mismo causa citotoxicidad a las células Vero; y E y F son para determinar si los medios de cultivo de las bacterias del ácido láctico del ensayo tienen capacidad neutralizante contra la VT por sí mismos. Cada sobrenadante de los cultivos de bacterias del ácido láctico de ensayo en G, H, I y J fue sometido a una disolución en serie 2x, después de que cada uno de los sobrenadantes de cultivos diluidos de bacterias del ácido láctico de ensayo y la VT se combinaron en cantidades de 400 ml + 100 ml; 300 ml + 200 ml; 200 ml + 300 ml; and 100 ml + 400 ml, respectivamente, y luego se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 10% durante 18 horas para determinar si aparecía un efecto citopático (ECP).

25 Se añadieron 300 mM de clorhidrato de semicarbazida (Sigma), que inhibe la producción de reuterina, a un fluido de cultivo de *L. reuteri* en una solución de glicerol de 250 mM para contener la producción de reuterina, y el sobrenadante se recogió igual que anteriormente. Se inocularon células Vero de 100 µl a una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 10% durante 24 horas para examinar si se formaban monocapas, siguiendo por la realización de los siguientes tratamientos: A: VT únicamente; B: VT + 25 mM de solución de glicerol; C: VT + sobrenadante del cultivo de *L. reuteri* en la solución de glicerol; y D: VT + sobrenadante del cultivo de *L. reuteri* en la solución de glicerol incubado después del tratamiento con inhibidor de la reuterina (véase arriba). Cada fluido de cultivo de *L. reuteri* tratado con o sin solución de glicerol e inhibidor de la reuterina en B, C y D fue combinado con VT en cantidades de 20 + 80; 30 + 70; 40 + 60; 50 + 50; 60 + 40; 70 + 30; y 80 + 20 µl, respectivamente, y luego se incubó a 37°C en una incubadora de CO₂ al 10% durante 18 horas para examinar si aparecía un efecto citopático (ECP). Tras la observación al microscopio, los fluidos de cultivo fueron teñidos con violeta cristal y fueron leídos sus valores de D.O. (densidad óptica) a 490 nm.

40 Se recubrieron placas de 96 pocillos con Gb₃ (globotriaosilceramida) (Sigma) bloqueados con albúmina de suero bovino (ASB) al 5% y se hicieron reaccionar con sobrenadante de cultivo de *L. reuteri* que se incubó en VT o en VT + una solución de glicerol de 250 mM. Después, se usó un anticuerpo monoclonal (acm) contra VT como anticuerpo primario, al que se añadió IgG de cabra antirratón conjugada con peroxidasa de rábano (PR), y, siguiendo al desarrollo de O-fenilendiamina, se leyó su densidad óptica (D.O.) a 490 nm por medio de un lector ELISA. Este experimento confirmaba la presencia de cualquier material inhibidor de la reacción entre el *L. reuteri* y el receptor Gb₃.

45 A partir de los resultados de interacción entre la VT y la solución de glicerol de 250 mM y entre la VT y un sobrenadante de cultivo de *L. reuteri* incubado en solución de glicerol tras recubrimiento con Gb₃, se verificó que una combinación de VT y de un sobrenadante de cultivo de *L. reuteri* producía un valor reducido de D.O. a niveles significativos en comparación con el de la VT únicamente, como en la Figura 1. Esto significa que podía detectarse indirectamente la presencia de un material que inhibía el enlace de la VT y del receptor Gb₃ en un sobrenadante de cultivo de *L. reuteri*.

50 Se recubrieron placas de 96 pocillos con sobrenadante de cultivo de *L. reuteri*, que se incubó en VT/VT + una solución de glicerol de 250 mM bloqueada con 3% de ASB y hecha reaccionar con VT. Después, se usó un anticuerpo monoclonal contra VT como anticuerpo primario, al que se añadió IgG de cabra antirratón conjugada con peroxidasa de rábano (PR) (H + L), y, siguiendo al desarrollo de O-fenilendiamina, se leyó su densidad óptica (D.O.) a 490 nm por medio de un lector ELISA. Este experimento confirmaba la presencia de un material interactivo con VT en el sobrenadante de *L. reuteri*.

60 Ejemplo 2

Investigación del efecto neutralizador de las bacterias del ácido láctico en la citotoxina Vero (VT) I y II segregada por E. coli O157:H7

65 Cuando se añadieron CST, caldo MRS y una solución de glicerol a las células Vero, no se vio efecto citopático. Además, cuando se añadieron tanto VT como caldo MRS/solución de glicerol a las células Vero se observó ECP en las células Vero, lo que demuestra que los propios fluidos de cultivo carecían de capacidad neutralizante contra la VT.

ES 2 329 020 T3

Cuando se sometió a cada sobrenadante de los cultivos de las bacterias del ácido láctico de ensayo al ajuste a un pH de 7,0, al filtrado y a la combinación con VT, se encontraron los resultados mostrados en la Tabla 1. Para el *L. bulgaricus* y el *L. casei*, apareció ECP en todo el intervalo de concentraciones, mientras que para el *L. reuteri* no apareció ECP en muchos de los sobrenadantes del glicerol, salvo en la proporción de bacterias del ácido láctico de ensayo a VT de 4:1, donde había mucho menos ECP. Así, había una discernible capacidad neutralizante contra la VT del sobrenadante del cultivo incubado en una solución de glicerol de 250 mM. Para la incubación en caldo MRS (+ 20 mM de glucosa), aparecía ECP a todas las concentraciones.

TABLA 1

Comparación de la capacidad inhibidora contra el efecto citopático (ECP) de células Vero por parte de la citotoxina Vero (VT) en sobrenadantes en cultivos de L. reuteri, L. bulgaricus y L. casei

Bacterias del ácido láctico	Sobrenadantes en cultivos de bacterias del ácido láctico (µl)	VT (µl)	Disolución en serie (× 2) de sobrenadantes en cultivos de bacterias del ácido láctico				
			0	1	2	3	4
<i>L. reuteri</i> (G)*	400	100	-	-	-	+ ^a	+ ^a
	300	200	-	-	+ ^a	+	+
	200	300	-	+ ^a	+	+	+
	100	400	+ ^a	+ ^a	+	+	+
<i>L. reuteri</i> (MRS)**	400	100	+ ^a	+	+	+	+
	300	200	+	+	+	+	+
	200	300	+	+	+	+	+
	100	400	+	+	+	+	+
<i>L. bulgaricus</i>	400	100	+	+	+	+	+
	300	200	+	+	+	+	+
	200	300	+	+	+	+	+
	100	400	+	+	+	+	+
<i>L. casei</i>	400	100	+	+	+	+	+
	300	200	+	+	+	+	+
	200	300	+	+	+	+	+
	100	400	+	+	+	+	+

*: El sobrenadante del cultivo se obtuvo siguiendo la incubación de *L. reuteri* en una solución de 250 mM de glicerol
 **: El sobrenadante del cultivo se obtuvo siguiendo la incubación de *L. reuteri* en caldo MRS (añadiendo 20 mM de glucosa)
 -: Sin ECP (efectos citopáticos)
 +: ECP
 a: ECP leves

Los resultados de la prueba ELISA competitiva y del ensayo de enlace entre la VT y el sobrenadante del cultivo de *L. reuteri* fueron sometidos a la prueba t de Student usando un programa Microcal Origin 6.1 (Microcal Software, Inc., Boston, Massachusetts).

Ejemplo 3

Administración de L. reuteri a los sujetos

En este ejemplo, a los sujetos se les dieron dos tabletas masticables dos veces al día, conteniendo cada tableta 1×10^8 UFC (unidades formadoras de colonias) de *L. reuteri* (SD2112: ATCC 55730), para dar una dosis diaria total de 4×10^8 UFC de *L. reuteri*. Todos los demás excipientes usados en las tabletas eran bien conocidos y cumplían las farmacopeas internacionales. El estudio se llevó a cabo en dos partes: una sesión de gastroscopia, con investigación del tracto gastrointestinal superior, y una sesión de ileoscopia, con investigación del intestino delgado distal (detalles más abajo). Los criterios de exclusión fueron: la toma de antibióticos dos semanas antes y durante el estudio; la toma de probióticos tres semanas antes y durante el estudio; tratamiento en curso con fármacos de tipo gastrointestinal; y enfermedades orgánicas serias con necesidad de tratamiento regular (por ejemplo, el cáncer). El protocolo para el tratamiento de los pacientes fue aprobado por el Comité Ético Danés y estaba en conformidad con la declaración de Helsinki. El estudio se realizó en Dinamarca.

Se usó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para comparar síntomas, valores de los análisis sanguíneos, contenido de *L. reuteri* en las heces y diferencias histológicas antes y después de la ingesta de *L. reuteri*. $P < 0,05$ se consideró significativo.

ES 2 329 020 T3

5 Todos los sujetos completaron el estudio. En la sesión de gastroscopia, fueron estudiados diez voluntarios sanos, con edades superiores a los 18 años, con hábitos alimenticios normales. Se llevó a cabo una gastroduodenoscopia tras un ayuno desde la tarde anterior en el día 0, antes de la ingesta de *L. reuteri*, y en el día 28, al final del estudio. Se tomaron biopsias del corpus y del antrum del estómago y de la tercera parte del duodeno, tanto para el cultivo de *L. reuteri* como para el examen histológico. El tamaño medio de la biopsia fue de 33 mg. Las biopsias se pusieron inmediatamente en TFS (2:1 vol/peso de muestra), almacenadas en hielo y transportadas a los Laboratorios Biogaia AB, de Lund, Suecia, para un análisis de los recuentos de *Lactobacillus reuteri*. El tiempo desde el aislamiento del tejido hasta el análisis estuvo dentro de 36 horas.

10 En la sesión de ileoscopia, fueron estudiados nueve sujetos con ileostomía siguiendo a una colectomía por colitis ulcerosa (3 sujetos) o por la enfermedad de Crohn (6 sujetos). El intestino delgado no tenía signos de inflamación en ningún sujeto. Se llevó a cabo una ileoscopia en el día 0 y en el día 28. Se tomaron biopsias como anteriormente dentro de los 20 cm distales del intestino delgado para un cultivo de *L. reuteri*, al igual que de otros lactobacilos y para el examen histológico.

15 Ejemplo 4

Análisis para la detección de microorganismos

20 Se recogieron muestras de heces de cada sujeto antes de la ingesta de *L. reuteri* (día 0) y al final del estudio (día 28). Las heces en los sujetos de ileoscopia (explicado más abajo) se tomaron del estoma. Siete voluntarios de la sesión de gastroscopia y cuatro voluntarios de la sesión de ileoscopia recogieron muestras de heces el día 42 (14 días después del final de la toma de *L. reuteri*). Las muestras (no menos de 5 g) se recogieron a un recipiente estéril y se colocaron inmediatamente en una nevera. Dentro de 24 horas, se añadieron 20 ml (1:5 peso/vol) de agua de peptona al 0,1%. La muestra se homogeneizó y se distribuyeron alícuotas en viales criogénicos antes de congelar inmediatamente a -70°C. Las muestras fueron enviadas, congeladas en hielo seco, al laboratorio Biogaia AB para su análisis de *Lactobacillus* total y de *L. reuteri*. Allí, las muestras se descongelaron, se diluyeron y se pusieron en placas sobre agar MRS-3 que contenía vancomicina (50 mg/l) para las placas de *L. reuteri* y de agar LBS (KEBOLAB AB, Lund, Suecia) para el recuento de *Lactobacillus* total. El MRS-3 es un agar MRS modificado (KEBOLAB AB, Lund, Suecia) que contiene un 2% de acetato sódico (peso/vol). El agar LBS se prepara según recomienda el fabricante, añadiendo 1,32 ml de ácido acético glacial por litro. Las placas de agar se incubaron de manera anaerobia (usando paquetes de gas BBL en tarros anaerobios) a 37°C durante 48 años. Se analizó el ADN de aislados seleccionados del estudio (véase más abajo) mediante RCP usando un *kit* de “huella dactilar” del ADN repPROTM de Bacterial Barcodes (Bacterial BarCodes, Inc., Houston, Texas), y las “huellas dactilares” fueron analizadas usando el *software* Bionumerics (Applied Maths BVBA, Saint-Martens-Latem, Bélgica).

40 Al inicio del estudio y antes de la administración del Producto del Estudio, ninguno de los sujetos de la sesión de gastroscopia tenía *L. reuteri* detectable en las heces (Tabla 2). Después de 28 días de ingesta de *L. reuteri*, todos ellos tenían *L. reuteri* en las heces en cantidades que oscilaban entre $1,0 \times 10^2$ y $3,5 \times 10^5$ UFC (unidades formadoras de colonias por gramo de materia fecal), con una media de $4,0 \times 10^4$ UFC/g, lo que indica un aumento significativo de *L. reuteri* vivo en las heces debido a la administración del Producto del Estudio. Cinco sujetos eligieron entregar muestras fecales en los días 42 y 56 (es decir, hasta 28 días después de la administración del Producto del Estudio). En estos sujetos, el *L. reuteri* persistió en las heces cuatro semanas después de la ingesta (Tabla 2).

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

Tabla 2. Recuperación de *L. reuteri* en las heces

Sujetos de gastroscopia												
Sujeto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media	DT
Tabletas consumidas	100	104	104	86	93	92	81	104	102	98	96	8
% cumplimiento	89	93	93	77	83	82	72	93	91	88	86	7
<i>UFC de L. reuteri/g en las heces</i>												
Día 0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Día 28	5,0E+03	1,0E+03	3,8E+04	3,5E+05	1,0E+02	1,0E+02	4,1E+03	2,0E+02	1,0E+02	1,9E+03	4,0E+04	1,1E+05
Día 42	*	1,4E+03	1,5E+03	*	*	1,2E+03	1,6E+03	6,0E+02	3,0E+02	5,0E+02	1,0E+03	5,3E+02
Día 56	*	*	1,3E+03	*	*	2,2E+03	1,0E+03	6,0E+02	*	1,0E+03	1,2E+03	6,0E+02

Sujetos de ileoscopia												
Sujeto	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Media	DT	
Tabletas consumidas	92	110	112	110	98	110	112	112	112	108	7	
% cumplimiento	82	98	100	98	88	98	100	100	100	96	7	
<i>UFC de L. reuteri/g en las salidas de ileostomía</i>												
Día 0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,00E+04	1,00E+02	nd	nd	nd
Día 28	nd	nd	nd	6,8E+03	1,0E+02	3,0E+02	5,0E+02	4,0E+04	1,0E+02	8,0E+03	1,6E+04	1,6E+04
Día 42	*	1,0E+03	*	6,0E+02	1,9E+03	6,0E+02	*	*	*	1,0E+03	6,1E+02	6,1E+02
Día 56	*	1,0E+03	*	8,0E+02	*	2,0E+02	*	*	*	6,7E+02	4,2E+02	4,2E+02

nd = no detectado ($< 1,0 \times 10^2$ UFC/g materia fecal); * indica que el sujeto no dio ninguna muestra.
 Las muestras fecales (salidas de ileostomía) fueron tomadas al reclutamiento (día 0) antes de la toma de suplementos de *L. reuteri* durante 28 días.
 Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias (UFC)/g en el peso húmedo de la materia fecal.

Ejemplo 5

Histología

5 Para evaluar cualquier respuesta inmunológica local, se determinaron los cambios en la cantidad de linfocitos B, linfocitos T y macrófagos. Las biopsias de referencia y las biopsias del día 28 se fijaron en formalina y se metieron en parafina. Subsiguientemente, se cortaron secciones de 4 μm y se tiñeron histoquímicamente usando técnicas estándar (Hematoxylineosin, van Gieson, PeriodicAcidSciff-Alcain y PeriodicAcidSciff-diestasa) e inmunohistoquímicamente. Los anticuerpos principales, obtenidos en DAKO, Glostrup, Dinamarca, lo fueron a: CD20 (linfocitos B),
 10 CD3, CD4+, CD8 (linfocitos T), CD68 (histiocitos), *Helicobacter* and Ki-67 (marcador de proliferación). La tinción inmunohistoquímica fue realizada en el inmunoteñidor DAKO TechMate™ 500 para obtener una tinción uniforme.

Un patólogo evaluó las biopsias. Sobre la base de la tinción histoquímica, se puntuaron (del 1 al 10) las lesiones tisulares según Madsen *et al.* (Gastroenterol. 1999; 116:1107-1114). Esta puntuación representa la suma numérica de cuatro criterios: ulceración, hiperplasia epitelial, la cantidad de células mononucleares y los granulocitos neutrófilos en la lámina propia. Sobre la base de la tinción inmunohistoquímica, se evaluó semicuantitativamente el número de células positivas CD20, CD3, CD4+, CD8 y CD68 en la lámina propia. Tres meses más tarde, las biopsias de referencia y del día 28 fueron sometidas a un proceso de cegamiento y reevaluadas por el mismo patólogo. Las correlaciones globales entre células teñidas positivas de referencia y las biopsias del día 28 se calcularon en cada evaluación y se compararon.
 15
 20

En el estómago (corpus y antrum) de dos sujetos se encontraron predominantemente células linfocitarias B el día 0 y de dos sujetos el día 28. Un sujeto tenía células dispersas en el estómago (antrum) el día 28. Cuatro sujetos tenían células sueltas en el duodeno el día 0 y 8 sujetos tenían predominantemente células sueltas en el duodeno el día 28. Ocho sujetos tenían células predominantemente sueltas de CD3, CD4+ y CD8 (linfocitos T) en el estómago (corpus y antrum) el día 0 y nueve sujetos tenían células predominantemente sueltas en el ventrículo (corpus y antrum) el día 28 (Tabla 3). Se encontraron células dispersas en el duodeno de 8 sujetos el día 0, y se encontraron linfocitos T predominantemente dispersos en el duodeno de 7 sujetos el día 28.
 25

Se encontraron predominantemente células histiocíticas sueltas en el estómago (corpus y antrum) en nueve sujetos el día 0 y en 5 sujetos el día 28. Se encontraron células predominantemente dispersas en el duodeno de 6 sujetos el día 0 y el día 28 (no los mismos 6 sujetos).
 30

Hubo una caída estadísticamente significativa en el número de histiocitos (CD68) en las biopsias del corpus ($p = 0,025$) y antrum ($p = 0,046$), y un número significativamente incrementado de células B (CD20) en el duodeno después de que los sujetos hubieran recibido *L. reuteri* ($p = 0,046$; Tabla 3). No se encontraron cambios significativos en la cantidad de linfocitos T debida a la ingesta de *L. reuteri*. La concordancia entre las dos investigaciones (la primera, un análisis no ciego, y la segunda un análisis ciego de las muestras histológicas) fue del 76% (Tabla 3). Para las células histiocíticas (CD68) del corpus y del antrum, la concordancia fue únicamente del 40% y del 65%, respectivamente. La concordancia de las células B (CD20) duodenales fue del 60%. Así, hubo alguna incertidumbre en estos hallazgos. La concordancia en los análisis de CD3, CD4+ y CD8 fue mucho más elevada (hasta del 90%; Tabla 3).
 35
 40

En la sesión de ileoscopia, todas las biopsias fueron histológicamente normales, y negativas para la *Helicobacter*. Las células Ki positivas fueron normales en todas las biopsias. Se encontraron células linfocitarias B predominantemente sueltas en 6 sujetos y células dispersas en 2 sujetos el día 0. Se observaron células sueltas en todos los sujetos el día 28. Se encontraron células CD3 (linfocitos B) predominantemente dispersas en 7 sujetos tanto el día 0 como el día 28. Se encontraron células CD4+ predominantemente dispersas en 7 sujetos el día 0 y grupos de células predominantemente colindantes en 7 sujetos el día 28. Se encontraron células CD8 predominantemente dispersas en 7 sujetos el día 0 y en 9 sujetos el día 28 (Tabla 3). Se encontraron células histiocíticas predominantemente dispersas en 7 sujetos tanto el día 0 como el día 28.
 45
 50

Hubo una cantidad significativamente mayor de linfocitos CD4+ después del suplemento con *L. reuteri* durante 28 días ($p = 0,046$; Tabla 3). No se encontraron cambios significativos en la cantidad de linfocitos B o de histiocitos debidos a la administración de *L. reuteri*. La concordancia entre las dos investigaciones fue generalmente elevada para todos los tipos de células examinados y para los hallazgos de CD4+ fue del 78%, indicando una buena fiabilidad en estos datos (Tabla 3). Todas las tinciones de *Helicobacter* fueron negativas.
 55

60

65

Tabla 3. Evaluación histológica de biopsias ileales de sujetos en la sesión de ileoscopia

Sujeto	Puntuación histológica el día 0	Células B CD20		Células T CD3 CD4 CD8			Histiocito CD68	Puntuación histológica el día 28	Células B CD20		Células T CD3 CD4 CD8			Histiocito CD68
11	0	X		XX	XX	XX	XX	0	X		X	XXX	XX	XX
12	0	XX		XXX	XXX	XX	XX	0	X		XX	XXX	XX	XX
13	0	-		XX	XX	XX	XX	0	X		XX	XXX	XX	X
14	0	X		XX	XX	XX	XX	0	X		X	XXX	XX	XX
15	0	XX		XXX	XX	XX	XX	0	X		XX	XXX	XX	X
16	0	X		XX	XX	XX	XX	0	X		XX	XXX	XX	XX
17	0	X		XX	XX	X	XX	0	X		XX	XX	XX	XX
18	0	X		XX	XX	X	X	0	X		XX	XX	XX	XX
19	0	X		XX	XXX	XX	X	0	X		XX	XXX	XX	XX

Se tomaron biopsias dentro de los 20 cm distales del intestino delgado y se fijaron y seccionaron para su examen histológico usando tinción inmunohistoquímica de los tipos celulares específicos (véase el texto).
 "-" = no se detectó célula alguna; "X" = células sueltas; "XX" = células dispersas o agregaciones de células; "XXX" = varios grupos de células colindantes.
 La puntuación histológica (1 a 10) clasifica el grado de lesiones tisulares.
 Análisis estadístico: Prueba de rangos con signo de Wilcoxon. A las muestras se les dio una puntuación nominal. Se dio a -, X, XX y XXX los valores 1, 2, 3 y 4, respectivamente, para el análisis estadístico.

Ejemplo 6

Bioquímica de la sangre

5 Las muestras sanguíneas se tomaron el día 0 y el día 28, y se analizaron para estudiar la hemoglobina, el hematocrito, los trombocitos, los leucocitos, la proteína C reactiva, el potasio, el sodio, la creatinina, la urea b, la glucosa p, el colesterol, las LAD (lipoproteínas de alta densidad, HDL en inglés), las LBD (lipoproteínas de baja densidad, LDL en inglés), las LMBD (lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL en inglés), los triglicéridos, la bilirrubina total, el urato, la ALAT, la fosfatasa alcalina y el lactato.

10

La mayoría de los análisis sanguíneos fueron normales, tanto antes como después de la ingesta de *L. reuteri*. Hubo algunos valores marginales en las variables sanguíneas, pero no se encontraron anomalías clínicamente significativas ni se observaron cambios sistemáticos tras el tratamiento.

15 Ejemplo 7

“Huella dactilar” del ADN

20 Se llevó a cabo un análisis de “huella dactilar” del ADN en aislados seleccionados de *L. reuteri* del estudio. Así, se tomaron aislados fecales de tres sujetos que habían consumido *L. reuteri* durante 28 días, así como un aislado de una biopsia duodenal y un aislado de una biopsia ileal, tomadas ambas el día 0, antes de la administración de *L. reuteri*. Se encontró que todos los aislados tenían un 98% de similitud genética entre sí. Todos estos aislados mostraban un 97% de similitud con SD2112, la cepa incorporada en las tabletas.

25 Ejemplo 8

Formulación de un producto para potenciar la función inmunitaria en los seres humanos

30 En este ejemplo se selecciona *L. reuteri* SD2112, ATCC 55730 usando los procedimientos anteriores para la neutralización de toxinas y reclutamiento de células CD4+ para añadir a un yogur corriente. La cepa de *L. reuteri* se cultiva y liofiliza usando procedimientos estándar para el desarrollo del *Lactobacillus* en la industria láctea. Este cultivo se añade después a leche previamente fermentada usando cultivos de yogur tradicionales, a un nivel de 10E+7 UFC/gramo de yogur, y el yogur es usado por seres humanos como forma de potenciar su función inmunitaria.

35 Aunque la invención ha sido descrita con referencia a realizaciones específicas, se apreciará que son posibles numerosas variaciones, modificaciones y realizaciones y, en consecuencia, ha de considerarse que todas tales variaciones, modificaciones y realizaciones están dentro del espíritu y el alcance de la presente invención.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. El uso del *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 que

5

- a. exhibe un buen enlace con las toxinas y un buen efecto neutralizador de las mismas;
- b. exhibe un buen reclutamiento de células CD4+ para la producción de una composición para potenciar la función inmunitaria en mamíferos.

10

2. El uso conforme a la reivindicación 1 en el que se usa un sobrenadante de un cultivo de *L. reuteri* ATCC 55730 para neutralizar toxinas bacterianas.

15

3. El uso conforme a la reivindicación 1 en el que el producto está formulado como un alimento que contiene células de la cepa seleccionada.

4. El uso conforme a la reivindicación 3 en el que el producto está formulado como una tableta que contiene células de la cepa seleccionada.

20

5. El uso conforme a la reivindicación 3 en el que el producto está formulado como un suplemento dietético que contiene células de la cepa seleccionada.

6. El uso conforme a la reivindicación 3 en el que el producto está formulado como un producto de confitería que contiene células de la cepa seleccionada.

25

7. El uso conforme a la reivindicación 3 en el que el producto está formulado como un fármaco que contiene células de la cepa seleccionada.

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

