

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional

16 de agosto de 2012 (16.08.2012) **WIPO | PCT**

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2012/107601 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 35/74 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A23C 9/127 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2011/000329

(22) Fecha de presentación internacional:

11 de noviembre de 2011 (11.11.2011)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201100133 9 de febrero de 2011 (09.02.2011) ES

(72) Inventores; e

(71) Solicitantes : **DE LAS HERAS DEL RIO, José Miguel** [ES/ES]; Asturias, 12-2º, E-33004 Oviedo - Asturias (ES). **BALTADJIEVA, Maria** [BG/BG]; 40 Svoboda Street, 4002 Plovdiv (BG). **LOPEZ LARREA, Carlos** [ES/ES]; Celestino Villamil, s/n, E-33006 Oviedo - Asturias (ES).

(74) Mandatario: **GARCIA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro Maria**; Vitruvio, 23, E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

— con reivindicaciones modificadas y declaración (Art. 19(1))

(54) Title: USE OF A STRAIN OF *LACTOBACILLUS BULGARICUS* FOR TREATING IMMUNOSENESCENCE

(54) Título : USO DE UNA CEPA DE *LACTOBACILLUS BULGARICUS* PARA EL TRATAMIENTO DE LA INMUNOSENESCENCIA

(57) Abstract: The invention relates to the use of a strain of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* for the preparation of a drug or food supplement for treating immunosenescence or deterioration of the immune system as a result of chronological ageing. Said strain exhibits systemic effects, both in the innate immune response and in the adaptive immune response.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* para la preparación de un fármaco o complemento alimenticio para el tratamiento de la inmunosenescencia o deterioro del sistema inmunitario como consecuencia del envejecimiento cronológico. Dicha cepa muestra efectos a nivel sistémico y tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa.



WO 2012/107601 A1

USO DE UNA CEPA DE *LACTOBACILLUS BULGARICUS* PARA EL TRATAMIENTO DE LA INMUNOSENESCENCIA

Objeto de la invención

- 5 La presente invención se refiere al uso de una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* para la preparación de un fármaco o complemento alimenticio destinado al tratamiento de la inmunosenescencia o deterioro de la capacidad defensiva del sistema inmune como consecuencia del envejecimiento cronológico. Concretamente se refiere al uso de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, aislada en la montañas de Bulgaria y depositada
10 en el "Nacional Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures" (NBIMCC) bajo el nº 8481.

Antecedentes de la invención

- Los probióticos son microorganismos no patógenos que ejercen una influencia positiva sobre la salud o la fisiología del huésped al ser ingeridos. Entre las propiedades
15 beneficiosas de estos microorganismos se encuentra su actividad inmunomoduladora. A lo largo de la vida se produce un envejecimiento del sistema inmune que ocasiona un deterioro de su capacidad defensiva que se conoce como inmunosenescencia y que implica una serie de modificaciones tanto en la respuesta innata como adaptativa. Esta proceso se caracteriza fundamentalmente por (1) la limitación del repertorio de los linfocitos T y la acumulación de
20 células oligoclonales de memoria efectora dirigidas frente a agentes infecciosos ubicuos; (2) la involución tímica y desaparición de células "naïve"; y (3) un estado inflamatorio crónico. El mecanismo basal de esta pérdida de eficacia inmunológica no se conoce pero tiene gran importancia desde un punto de vista clínico, particularmente la disfunción de la respuesta inmune humoral responsable de la eficacia de la vacunación. Existe una clara asociación
25 entre la funcionalidad del sistema inmune y la longevidad de los individuos, encontrándose considerables evidencias de que la inmunosenescencia implica mayor morbilidad y mortalidad. En este sentido, evitar o retrasar el deterioro del sistema inmune desde edades tempranas se considera decisivo para conseguir un mejor estado general y una mayor longevidad.
- 30 Entre los organismos probióticos inherentes al aparato digestivo de los humanos, es conocido el efecto de los *Lactobacillus*, presentando un efecto en la intolerancia a la lactosa, efecto sobre el sistema inmune, etc, debido a su capacidad para controlar las infecciones manteniendo un equilibrio adecuado en la microflora del intestino. Diferentes cepas de *Lactobacillus* se han utilizado para la preparación de productos con adecuadas propiedades
35 organolépticas y con características profilácticas y terapéuticas.

Dentro de los *Lactobacillus*, la aplicación de las cepas conocidas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ha estado limitada al área de productos lácticos fermentados y su actividad está limitada a un corto plazo de tiempo.

5 Como ejemplos, las patentes BG63961, BG63962 y BG63963 divulgan que cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* son usadas como cultivos para yogur búlgaro y otros productos lácteos fermentados. La patente BG61476 divulga la posibilidad de combinación de una sustancia biológicamente activa procedente del cultivo de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* con productos naturales para la preparación de aditivos alimenticios.

10 Las patentes UA63201, UA63202 y UA64163 divulgan que una cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 9702 cultivada bajo determinadas condiciones produce una sustancia con propiedades hepatoprotectoras, gastroenterológicas y moduladoras del sistema inmune, pero no describen datos experimentales clínicos concretos que soporten esta afirmación.

15 En la solicitud de patente WO2008/043161 se describe la cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, depositada en el "Nacional Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures" (NBIMCC) bajo el nº 8481, y se indica de forma general que puede ser usada para la preparación de productos farmacéuticos o alimenticios con propiedades profilácticas y terapéuticas, mostrando efecto a nivel local del aparato digestivo.

20 En la presente invención, se describe el uso, hasta ahora no descrito de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, NBIMCC nº 8481, evaluando parámetros a nivel sistémico. La mayoría de los estudios inmunológicos realizados hasta ahora con probióticos sólo han demostrado efectos a nivel local de mucosa intestinal y no a nivel de sangre periférica.

25 **Descripción de la invención**

La presente invención se refiere al uso de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, depositada en el "Nacional Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures" (NBIMCC) bajo el nº 8481 para la preparación de fármacos o complementos alimenticios destinados al tratamiento de la inmunosenescencia o deterioro de la capacidad defensiva del sistema inmunitario debido al envejecimiento cronológico. Como consecuencia de la edad, se pueden observar una serie de cambios en el funcionamiento del sistema inmune que implican una peor capacidad defensiva.

30 El producto farmacéutico o alimenticio preparado a partir de esta cepa de probiótico puede ser un comprimido o cápsula para su administración oral al paciente. Preferiblemente, cada cápsula contiene 400mg de la cepa de probiótico.

El producto farmacéutico o alimenticio también puede presentarse en forma de sobres.

La administración de un fármaco conteniendo esta cepa de probiótico ha demostrado tener implicaciones en una serie de modificaciones tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa.

En cuanto a la respuesta adaptativa, la cepa de probiótico actúa sobre distintos parámetros como son:

- 5 - la frecuencia de la subpoblación de linfocitos T CD8+CD28. Esta población es el principal factor que define el perfil de riesgo inmunológico (IRP), asociado a la longevidad de los individuos, su disminución representa un efecto claramente beneficioso ralentizando la senescencia del sistema inmune
- 10 - la frecuencia de las subpoblaciones de células naïve CD45RA+CCR7+La capacidad de un individuo de reconocer y responder frente a nuevo antígenos depende en gran medida de la frecuencia de estas subpoblaciones. El aumento de las mismas implicaría una mayor y mejor capacidad de respuesta frente a patógenos, tumores,...
- los linfocitos T CD4+ de reciente migración tímica, que representan un estado muy inmaduro, cuyo aumento podría estar reflejando cierto grado de "rejuvenecimiento" del sistema inmunológico.
- 15 - la proteína sirtuina-1 (SIRT1), que tiene un papel demostrado en evitar la senescencia celular y aumentar la longevidad.

Además de los efectos de la cepa de probiótico sobre la inmunidad adaptativa también se han encontrado efectos en determinados parámetros de la inmunidad innata, como son los niveles de células NKs, implicadas fundamentalmente en la defensa anti-viral y anti-tumoral. Esta población presente una clara disminución en el proceso de envejecimiento, con lo que su aumento resultaría claramente beneficioso. Dentro de la respuesta innata, la cepa de probiótico tiene efecto en la producción de β -defensinas, moléculas que suponen una primera línea defensiva frente a bacterias y virus.

El efecto de la cepa *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, NBIMCC nº 8481 en los parámetros antes mencionados ha sido demostrada en un estudio que a continuación se describirá y que ilustra los efectos de la misma sobre el sistema inmune de los individuos a los que se administra un fármaco que contiene dicha cepa (grupo probiótico) frente a los individuos que reciben un fármaco con placebo (grupo placebo).

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 es una representación gráfica de las distribuciones de poblaciones de linfocitos B, T y células NK en el grupo placebo y en el grupo probiótico, a tiempo cero (antes de la ingesta del probiótico, t=0), a los tres meses (t=3) y a los seis meses (t=6) de la ingesta de probiótico.

- La figura 2 es una representación gráfica de las distribuciones de linfocitos T CD8+CD28^{null} y linfocitos T CD8+CD28+CD27+ en el grupo probiótico y placebo a tiempo cero, tres y seis meses de la ingesta del probiótico.
- La figura 3 muestra la distribución de distintas subpoblaciones tanto en linfocitos TCD4+ como CD8+ en individuos jóvenes y ancianos.
- La figura 4 es una representación gráfica de la evolución de la frecuencia de poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 del grupo probiótico
- La figura 5 representa la población de células CD45RA+ en jóvenes y ancianos.
- La figura 6 muestra la evolución de poblaciones de linfocitos T CD4+CD45RA+/CD31+ en cinco individuos representativos del grupo probiótico y del grupo placebo.
- La figura 7 muestra la población de β -defensinas del grupo probiótico y grupo placebo a cero, tres y seis meses de la ingesta del probiótico.
- La figura 8 muestra niveles de mRNA SIRT1 del grupo probiótico y placebo a diferentes tiempos de la ingesta del probiótico.
- La figura 9 muestra dos geles 2D-PAGE (electroforesis de poliacrilamida de dos dimensiones), antes (9a) y después (9b) de la toma del probiótico.

Descripción detallada de la invención

- Para completar la descripción se incluye un estudio que ilustra los efectos de la cepa de probiótico sobre el sistema inmune de los individuos a los que se administra un fármaco que contiene dicha cepa

Estudio realizado

- En el estudio realizado se han evaluado las posibles propiedades beneficiosas sobre la respuesta inmune de una cepa seleccionada *in vitro* de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NBIMCC nº8481 como probiótico.
- El objetivo del estudio sobre el sistema inmune fue valorar la eficacia de la ingesta de cápsulas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* liofilizado en la potenciación de la respuesta inmune en ancianos. El objetivo principal fue estudiar la mejoría que produce sobre distintos aspectos de la respuesta inmune la exposición a la cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* en personas mayores de 65 años.
- Para este análisis se seleccionó un grupo de individuos mayores de 65 años en los que, como consecuencia de la edad, se puede observar una serie de cambios en el funcionamiento de su sistema inmune que implican una peor capacidad defensiva. Los efectos beneficiosos del probiótico resultan más evidentes en los individuos de edad avanzada debido a este estado de inmunodeficiencia asociada a la edad.
- Los pasos seguidos en el desarrollo del proyecto fueron los siguientes:
- Captación de voluntarios para el desarrollo del estudio

-Extracción y procesamiento de las muestras de sangre periférica a tiempo cero (nivel basal), a los tres y a los seis meses del inicio del estudio
-Seguimiento del cumplimiento del protocolo del estudio por parte de los voluntarios y recogida de datos clínicos por parte de los investigadores

5 *Materiales y Métodos*

- Caracterización de distintas subpoblaciones celulares por citometría de flujo
- Cuantificación de citocinas en suero de los voluntarios mediante tecnología xMAP de Luminex
- Cuantificación en suero de inmunoglobulinas (Ig A, Ig G, Ig M) y factores del complemento por turbidimetría y nefelometría.
- Estimulación *in-vitro* (anti-CD3 y LPS) de células mononucleares de células de sangre periférica para determinar posibles cambios en la producción de distintas citocinas/factores solubles en el sobrenadante de los mismos.
- Capacidad oxidativa/fagocítica de la población polimorfonuclear
- Valoración de la función tímica (cuantificación de TRECS por RT-PCR), expresión de CD31 por citometría de flujo.
- Recogida y almacenamiento de suero, DNA y RNA de los individuos en estudio
- Cuantificación por ELISA de α y β -defensinas
- Cuantificación por RT-PCR de la sirtuina-1
- Comparación de los proteinogramas de voluntarios antes y después de la ingesta de cápsulas de probiótico mediante técnicas proteómicas.
- Analíticas de control (hematología, bioquímica y análisis de orina)
- Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS 15.0. En aquellos casos en que los datos mostraron una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov) se realizaron las comparaciones entre los distintos tiempos utilizando la prueba T para datos pareados. En los casos en los que la distribución de los datos no fue normal se compararon mediante el test de Wilcoxon.

Desarrollo del estudio

- En la visita cero se comprobaron los criterios de inclusión necesarios para poder participar y se realizaron las pruebas necesarias para el estudio.

Se clasificaron de forma aleatoria a los participantes en uno de los dos grupos:

- Grupo probiótico (grupo de individuos a los que se administraron cápsulas de probiótico)
- Grupo placebo (grupo de individuos a los que se administraron cápsulas de placebo, sin probiótico)

- Se realizaron todas las pruebas del estudio, recogida de datos y analíticas y se les proporcionaron las cápsulas con *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NBIMCC nº 8481 liofilizado o con placebo. Cada dos meses los voluntarios recibieron el lote de cápsulas

con placebo o *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NBIMCC nº 8481 liofilizado y se les evaluó tras 3 y 6 meses (se les realizó recogida de datos y analítica) desde el inicio del tratamiento, comparando los resultados con los de la situación basal al inicio del estudio (visita cero).

- 5 En el estudio se incluyeron 52 sujetos con edad superior a 65 años. Los voluntarios se dividieron en dos grupos (probiótico, n=28; placebo, n =24), El diseño fue idéntico a un ensayo clínico: prospectivo, doble ciego, controlado con placebo. A los individuos en estudio se les administraron 3 cápsulas al día, tanto de probiótico como de placebo, durante seis meses.

10 Resultados

- Características hematológicas de los ancianos en estudio:

Se analizaron por citometría de flujo las subpoblaciones leucocitarias de los individuos en estudio. No se encontraron diferencias en los porcentajes de células polimorfonucleares, monocitos ni linfocitos. Tampoco se encontraron diferencias en la distribución de las poblaciones de linfocitos B y T en ninguno de los dos grupos. En los individuos que tomaron el probiótico se produjo un aumento significativo en el porcentaje de células NK tanto a los tres como a los seis meses (figura 1).

- Perfil de riesgo inmunológico (IRP):

- En el estudio inmunológico OCTO (Pawelec G., Akbar A., Caruso C., Effros R., Grubeck-Loebenstein B., Wikby A., "Is immunosenescence infections?" *Trends immunol.* August 2004. Ferguson FG, Wikby A, Maxon P, Olsson J, Johansson B " Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison of survivors and nonsurvivors" *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1995" realizado en Suecia entre personas de más de ochenta años se identificó un perfil de riesgo inmunológico (IRP) que relaciona ciertos parámetros inmunológicos con una mortalidad aumentada. La principal variable asociada con una mayor mortalidad fue la subpoblación celular de linfocitos T CD8+CD28^{null}. Estas células representan un estadio altamente diferenciado dentro del conjunto de linfocitos T CD8+, con una capacidad reducida para enfrentarse a nuevas patologías.

- Los individuos que tomaron el probiótico presentaron una disminución significativa en el porcentaje de esta población envejecida a los tres y a los seis meses del inicio de la ingesta. Los niveles se mantuvieron estables a lo largo del tiempo en los individuos del grupo placebo.

- Dentro de la población de linfocitos T CD8+, en los individuos del grupo probiótico, también encontramos diferencias significativas en los niveles de la subpoblación CD27+CD28+, que representa un grupo de células poco diferenciadas, capaces de reconocer nuevos antígenos (figura 2).

- Estado de diferenciación en las distintas subpoblaciones de células T en individuos de edad avanzada:

Existen diversos marcadores cuya expresión permite distinguir el estado de diferenciación de los linfocitos T, fundamentalmente en el caso de las células T CD8+, más afectadas por el proceso de envejecimiento ya desde edades tempranas. Dependiendo de la expresión de CD45RA y del receptor de quimiocinas CCR7, los linfocitos T se pueden dividir en: naïve (NAIVE; CD45RA+CCR7+), memoria central (CM; CD54RA-CCR7+), memoria efectora (EM; CD45RA+CCR7-) y memoria efectora diferenciada de forma terminal (EMRA; CD45RA+CCR7-). Aquellos individuos que presenten un sistema inmunológico "joven" y más funcional presentarán mayor frecuencia de la subpoblación CD45RA+CCR7+. La población CD45RA+CCR7- representa aquellas células más envejecidas y con menor capacidad de respuesta y será más frecuente en individuos con sistemas inmunológicos más senescentes (figura 3).

En los individuos del grupo probiótico se observó un aumento de la población CD45RA+CCR7+ (células naïve) tanto en linfocitos T CD4+ como en linfocitos T CD8+. El aumento en esta población, esencial para responder y desarrollar respuestas inmunológicas frente a nuevos antígenos, es mucho más rápido en los linfocitos T CD8+, produciéndose un aumento importante de esta población a los tres meses y manteniéndose los niveles hasta los seis meses. Sin embargo en los linfocitos T CD4+ este aumento es mucho más gradual y constante. En los voluntarios que tomaron el placebo no se observó ninguna diferencia dentro de estas poblaciones (figura 4).

- Proximidad tímica de linfocitos T CD4+ tras la ingesta del probiótico.

En las células CD45RA+ la expresión de CD31 se relaciona con mayor grado de inmadurez, correspondiendo este fenotipo a las células de más reciente migración tímica. Como se puede observar en la figura 5 representativa los individuos jóvenes presentan esta población claramente incrementada respecto a los individuos de mayor edad.

Al analizar la expresión de CD31 en las células CD45RA+ se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de ésta tanto a los tres como a los seis meses en aquellos individuos que tomaron el probiótico (figura 6).

- Cuantificación de α y β -defensinas:

Las defensinas son proteínas de cisteína ricas en iones, se encuentran en vertebrados e invertebrados y funcionan como antibióticos naturales que se hallan en la superficie de la piel. Son activas contra bacterias, hongos y virus. La mayoría de las defensinas actúan al penetrar en la membrana plasmática microbiana, una vez que han penetrado, forman un poro que produce la muerte celular.

Las defensinas son péptidos altamente conservados en la escala evolutiva formando parte de la respuesta inmune innata, tienen un tamaño de 2-5 kilodaltons (típicamente de 30-45

aminoácidos) y presentan tres puentes disulfuro. En el humano se sintetizan principalmente en epitelios y leucocitos. Sus propiedades antimicrobianas son de amplio espectro (antibacterianas, antifúngicas, antivirales) variando en efectividad microbicida según su estructura y carga catiónica neta. De acuerdo con su patrón molecular de puentes disulfuro y distribución genómica se clasifican en las familias alfa (α), beta (β) y teta (θ).

Las α -defensinas 1-4 tienen actividad anti-VIH y se ha demostrado que aunque tienen la propiedad de unirse al péptido C1q y activar de esta forma la vía clásica del sistema del complemento. Adicionalmente tienen un efecto quimiotáctico para linfocitos T, monocitos y células dendríticas maduras, además de inducir la síntesis de citocinas. En este estudio no se ha encontrado ninguna diferencia en la expresión de α -defensina 1, ni en las personas que tomaron el placebo ni en las que tomaron el probiótico. Se hipotetiza que las β -defensinas bloquean eventos tardíos de la replicación de virus y otros patógenos. Inducen señales intracelulares al interactuar con receptores de quimiocinas y receptores similares a Toll (TLRs), cuyas vías promueven respuestas inmunes adaptativas reclutando células dendríticas y T al sitio de invasión.

En este estudio se ha encontrado un aumento significativo de estos péptidos antimicrobianos tanto a los tres como a los seis meses de comenzada la ingesta de las cápsulas de probiótico. No se encontró ninguna diferencia en los voluntarios que tomaron placebo (figura 7).

• Estudio de los niveles de sirtuina-1 mediante RT-PCR:

La sirtuina-1 (SIRT1), es el miembro de la familia de las sirtuinas mejor estudiado con respecto al aumento de longevidad y a enfermedades relacionadas con la edad. Se cree que juega un papel crucial en el proceso de envejecimiento por varias razones. La SIRT1 está disminuida en células senescentes y en el envejecimiento. La reducción calórica, claramente relacionada con la longevidad, induce la producción de SIRT1, posiblemente aumentando la supervivencia celular. El aumento de su expresión también está relacionado con el incremento en la biogénesis mitocondrial, muy relacionado este proceso con la longevidad y el envejecimiento. Un activador de la SIRT1 es el resveratrol cuyos efectos beneficiosos sobre el rejuvenecimiento celular se ha demostrado que están mediados por el aumento de SIRT1.

Se cuantificaron por RT-PCR los niveles de expresión de mRNA de SIRT1 en células mononucleares de sangre periférica en los individuos en estudio. En los voluntarios que tomaron el probiótico se observó un aumento en los niveles de SIRT1 a los tres meses. A los seis meses los niveles de SIRT1 siguen aumentados respecto al tiempo cero, pero han disminuido respecto a los 3 meses. No se observaron cambios en el grupo placebo (figura 8).

- Estudios de fagocitosis y oxidación

Se realizaron varios experimentos para evaluar la capacidad fagocítica y oxidativa de la población de polimorfonucleares de los voluntarios. No se encontró ninguna diferencia significativa en los parámetros de fagocitosis y oxidación después de la ingesta del probiótico. Los valores en el grupo de individuos que tomaron el probiótico y en el grupo placebo fueron similares.

- Estudios de proteómica

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función. El proteoma es la dotación completa de proteínas, incluyendo las modificaciones hechas en un conjunto particular de proteínas, producidas por un organismo o sistema.

Se realizó el estudio proteómico de cuatro muestras de voluntarios antes y después de la ingesta del probiótico y no se encontraron diferencias en su proteograma. En la siguiente figura 9 se muestran dos geles 2D-PAGE (electroforesis de poliacrilamida de dos dimensiones), antes y después de la toma del probiótico.

Tras el análisis estadístico de los resultados obtenidos no se observó ninguna diferencia significativa en el proteinograma de los individuos en estudio.

Conclusiones

Tras el análisis de los resultados se ha llegado a las siguientes conclusiones sobre los efectos que la cepa probiótica ejerce sobre el organismo que la ingiere:

- Disminución de la frecuencia de la subpoblación de linfocitos T CD8+CD28^{null}, lo que representa un efecto claramente beneficioso ralentizando la senescencia del sistema inmune. En contrapartida se observó un incremento de la subpoblación menos diferenciada CD8+CD27+CD28+.
- Aumento tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+ de la subpoblación naïve CD45RA+CCR7 tanto a los tres como a los seis meses, lo que implica una mayor y mejor capacidad de respuesta frente a patógenos, tumores...
- Aumento en la proporción de linfocitos T CD4+ de reciente migración tímica, lo que refleja, junto con la disminución de poblaciones muy diferenciadas, cierto grado de rejuvenecimiento del sistema inmunológico.
- Incremento en los niveles de mRNA de SIRT1 tras la ingesta del probiótico, lo que podría traducirse en un aumento de longevidad y evitaría la senescencia celular.
- Aumento progresivo en los niveles de células NKs, implicadas fundamentalmente en la defensa anti-viral y anti-tumoral.
- Aumento en la producción de β -defensinas, lo que implicaría un aumento defensivo frente a bacterias y virus.

A la vista de los resultados, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, NBIMCC 8481 ha demostrado tener efectos a nivel sistémico, mejorando la respuesta del sistema inmune, el cual sufre un importante deterioro como consecuencia del envejecimiento cronológico.

Reivindicaciones

- 1.- Uso de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, depositada en el "Nacional Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures" (NBIMCC) bajo el nº 8481 para la preparación de un fármaco o complemento alimenticio administrable por vía oral para el
- 5 tratamiento de la inmunosenescencia o deterioro de la capacidad defensiva del sistema inmunitario como consecuencia del envejecimiento cronológico.
- 2.- Uso según la reivindicación 1 en el que el tratamiento de la inmunosenescencia o deterioro de la capacidad defensiva del sistema inmunitario como consecuencia del envejecimiento cronológico implica una serie de modificaciones tanto en la respuesta
- 10 inmunitaria innata como en la adaptativa consistentes en:
- disminución de la frecuencia de la subpoblación de linfocitos T CD8+CD28
 - aumento tanto en linfocitos CD4+ como CD8+ de la subpoblación naïve CD45RA+CCR7+
 - aumento en la proporción de linfocitos T CD4+ de reciente migración tímica
 - 15 -incremento de los niveles de mRNA de sirtuína-1 (SIRT1)
 - aumento de los niveles de células NK
 - aumento en la producción de β -defensinas
- 3.-Uso según la reivindicación 1 caracterizado porque el fármaco es una cápsula que contiene dicha cepa *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* liofilizado.
- 20 4.- Uso según la reivindicación 3 caracterizado porque cada cápsula contiene 400 mg de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS
recibidas por la oficina Internacional el 18 de junio de 2012 (18.06.2012)

- 1.- Uso de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, depositada en el "National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures" (NBIMCC) bajo el nº
- 5 8481 para la preparación de un fármaco o complemento alimenticio administrable por vía oral para el tratamiento de la inmunosenescencia o deterioro de la capacidad defensiva del sistema inmunitario como consecuencia del envejecimiento cronológico, que implica modificaciones tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa consistentes en:
- 10 -disminución de la frecuencia de la subpoblación de linfocitos T CD8+CD28
-aumento tanto en linfocitos CD4+ como CD8+ de la subpoblación naïve CD45RA+CCR7+
- aumento en la proporción de linfocitos T CD4+ de reciente migración tímica
-incremento de los niveles de mRNA de sirtuina-1 (SIRT1)
- 15 -aumento de los niveles de células NK
-aumento en la producción de β -defensinas
- 2.-Uso según la reivindicación 1 caracterizado porque el fármaco es una cápsula que contiene dicha cepa *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* liofilizado.
- 3.- Uso según la reivindicación 2 caracterizado porque cada cápsula contiene 400 mg
- 20 de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*.

DECLARACION SEGUN EL ARTICULO 19 (1)

En el documento corregido se presentan las siguientes modificaciones:

1. Se ha modificado la reivindicación 1 introduciendo las características descritas en la reivindicación inicial 2.
2. Eliminación de la reivindicación inicial 2: sus características han pasado a la reivindicación 1.

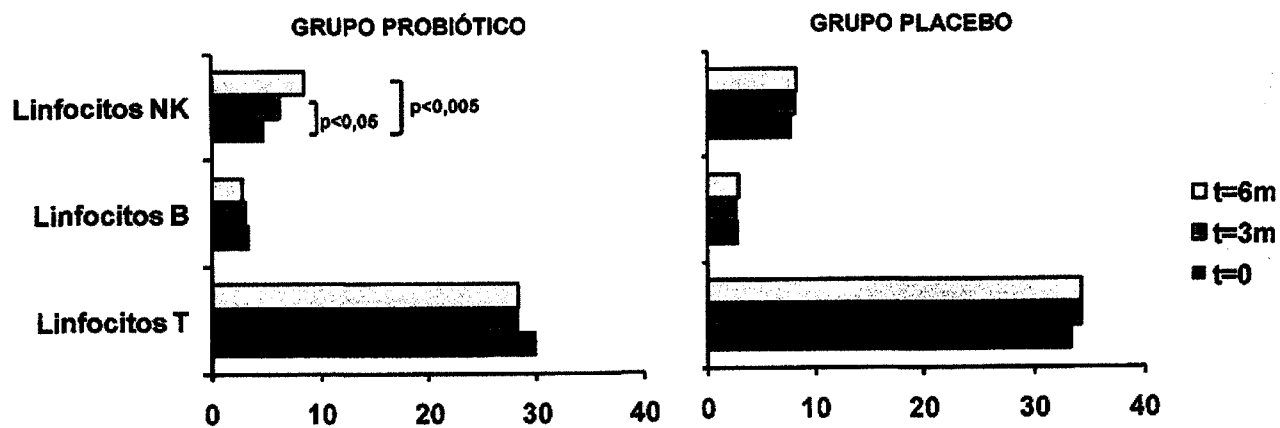


FIGURA 1

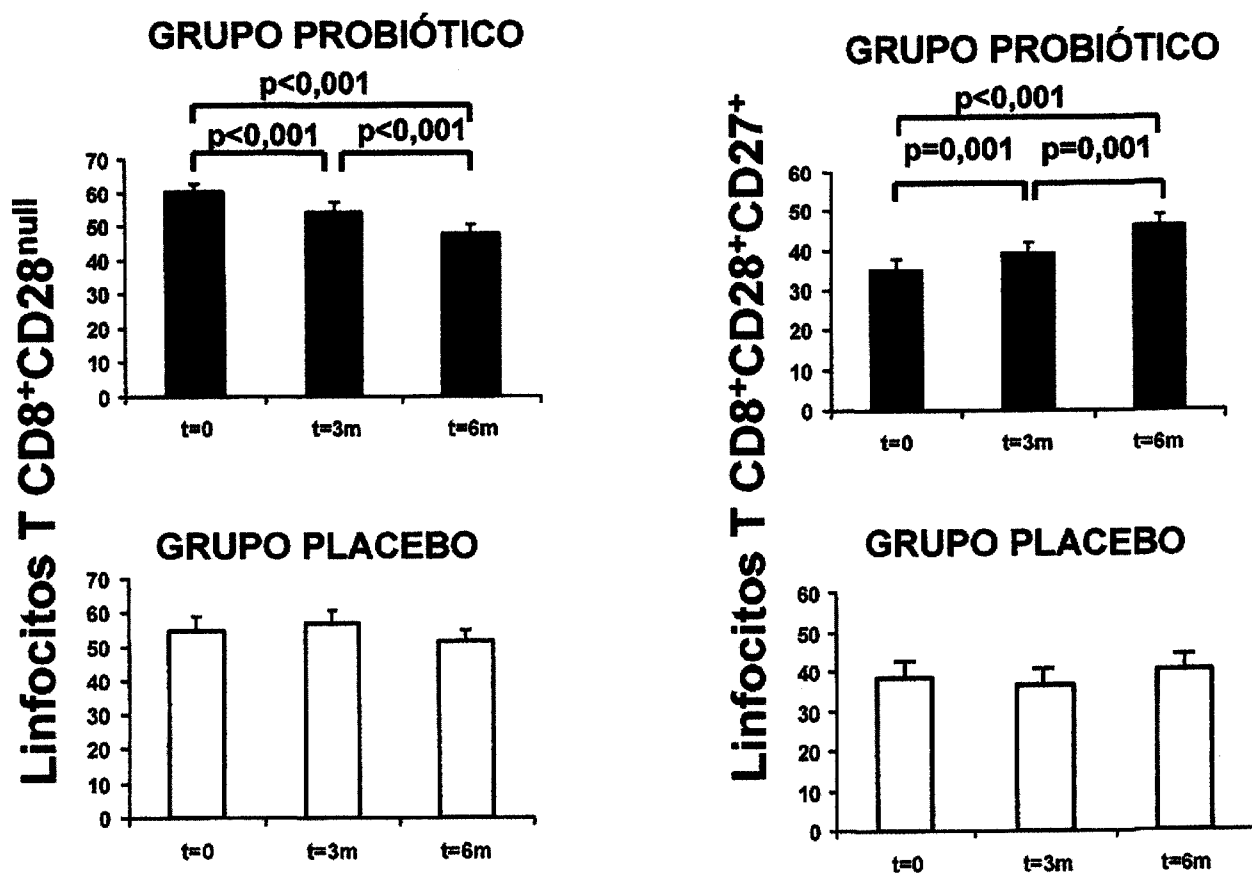


FIGURA 2

2/5

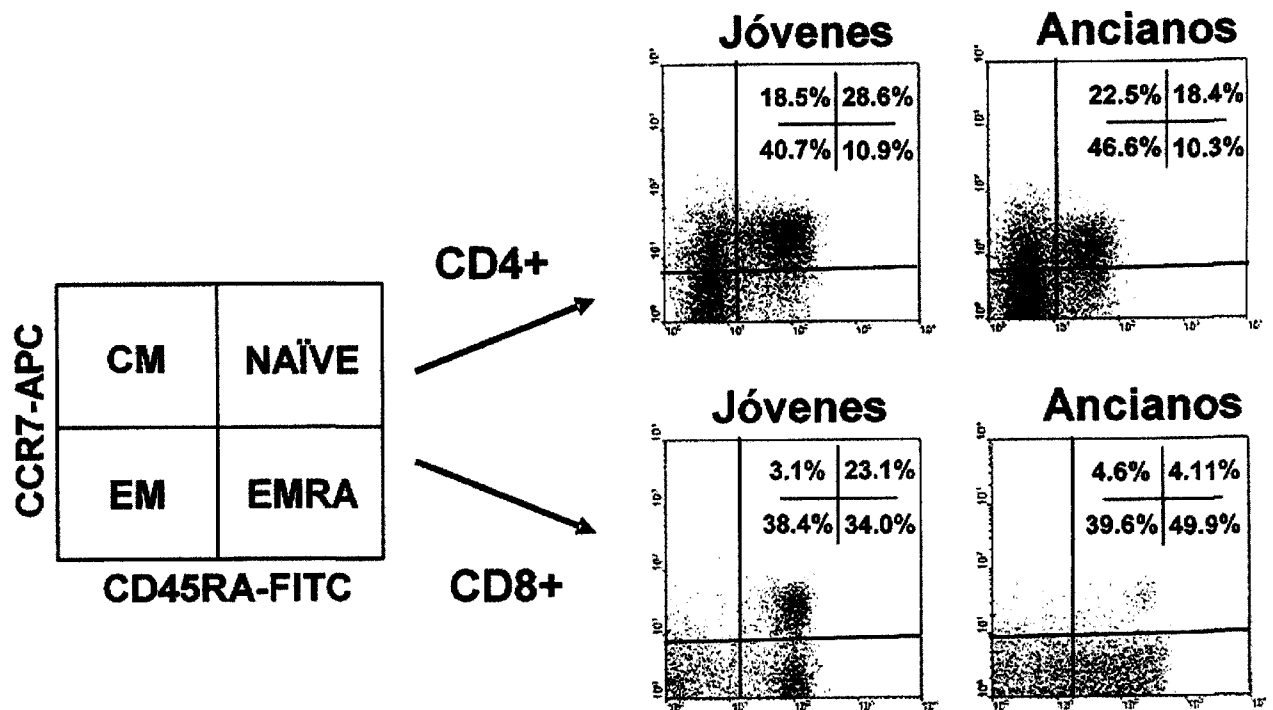


FIGURA 3

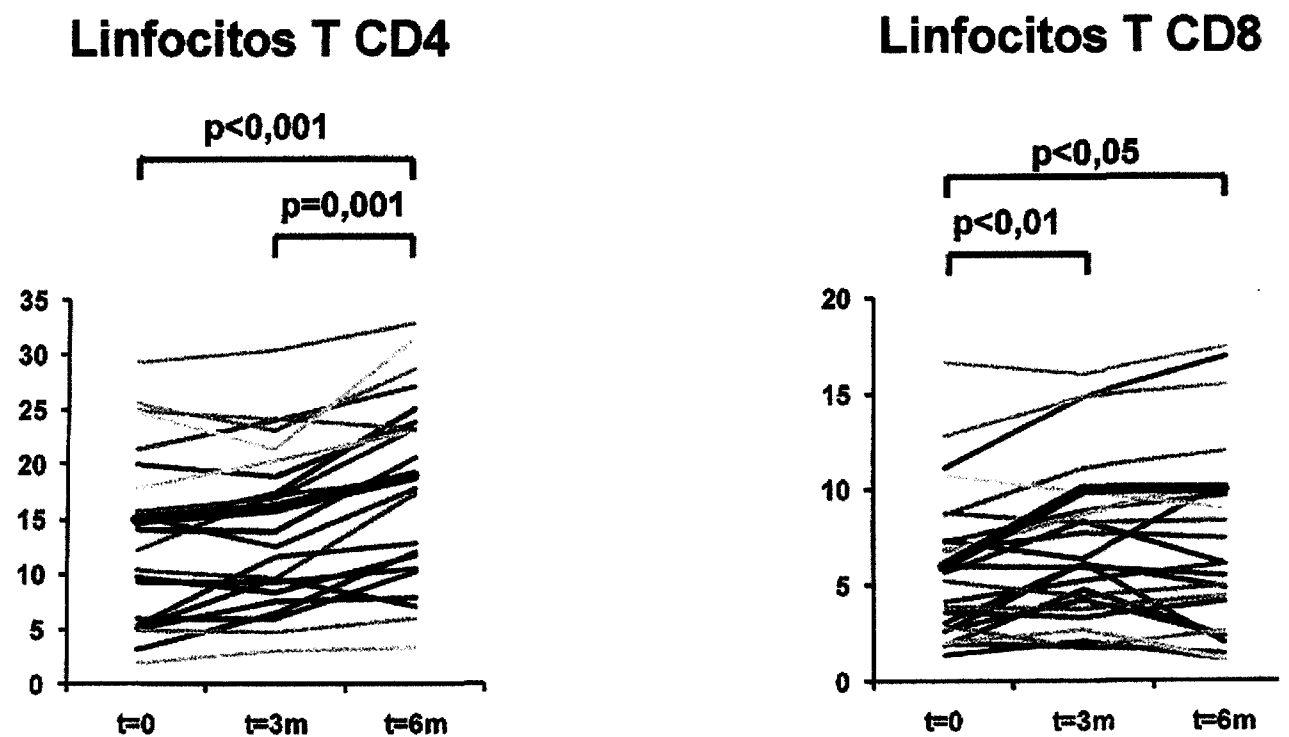


FIGURA 4

3/5

JÓVENES ANCIANOS

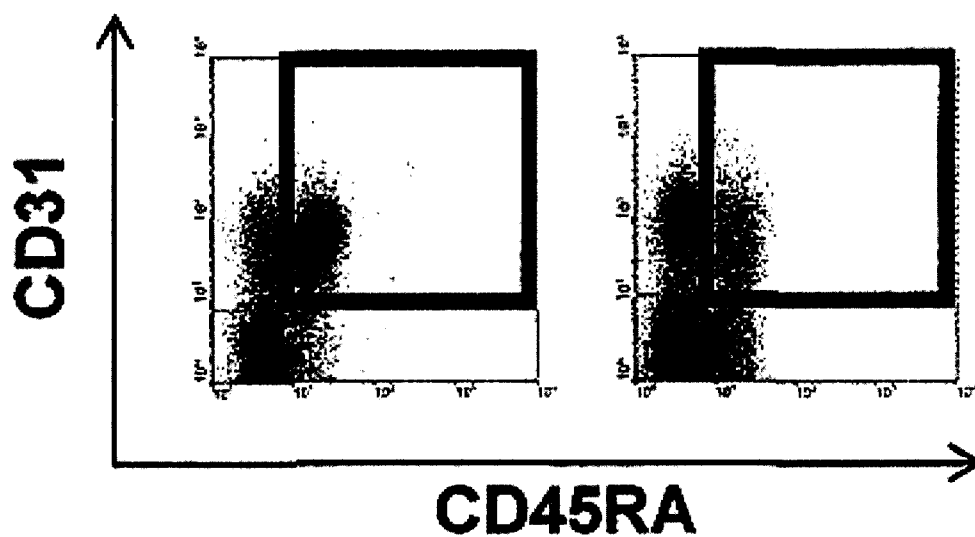


FIGURA 5

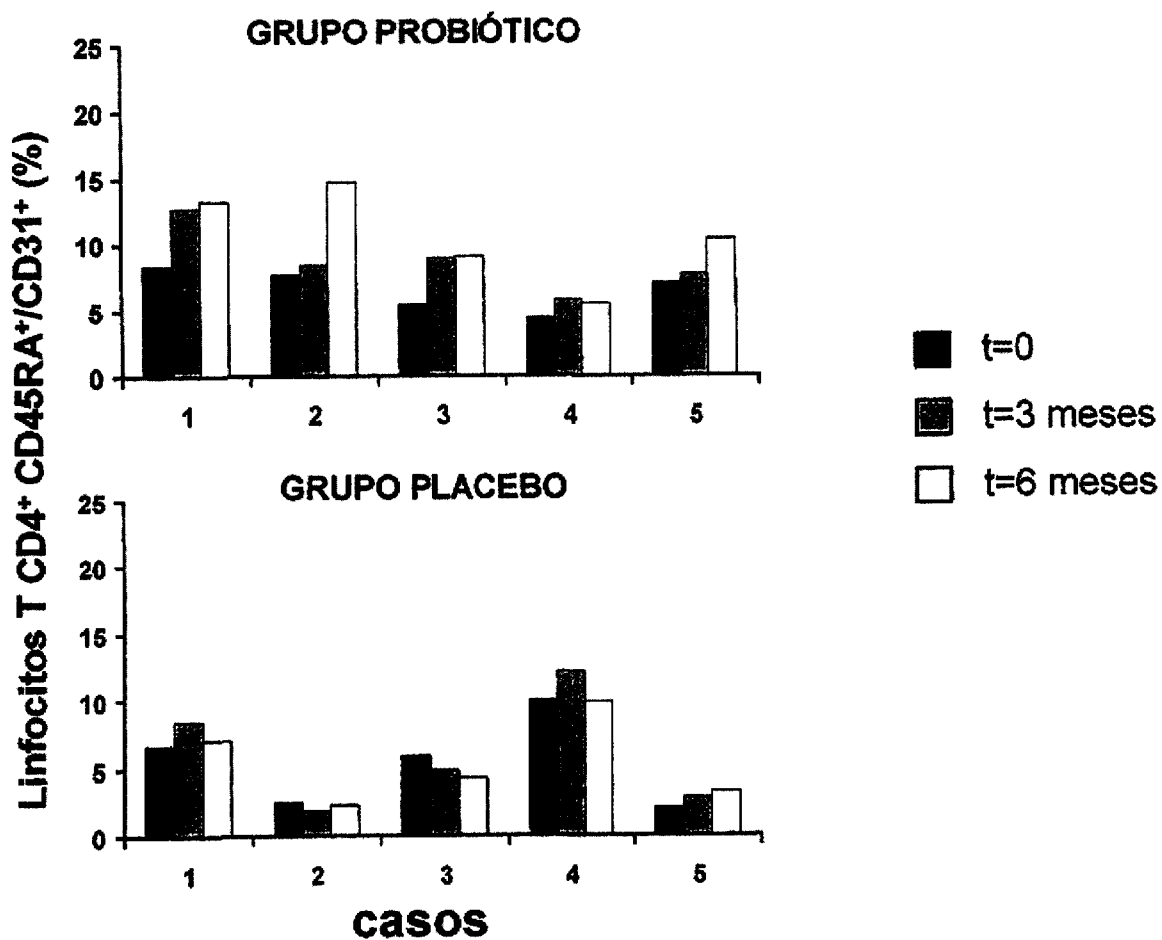


FIGURA 6

4/5

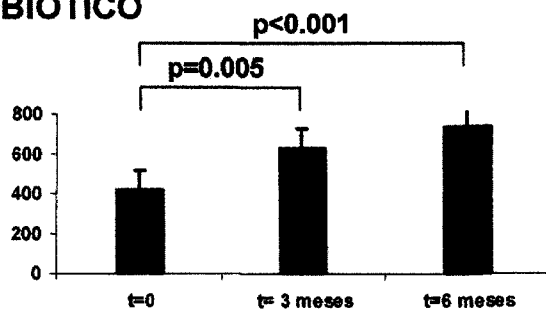
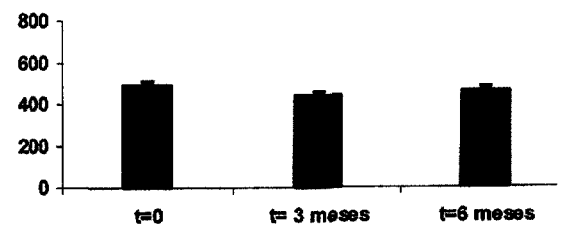
PROBIÓTICO**PLACEBO**

FIGURA 7

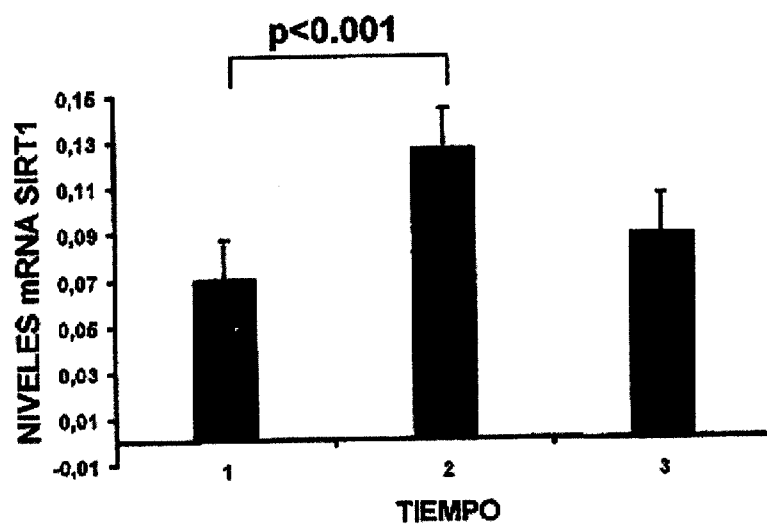
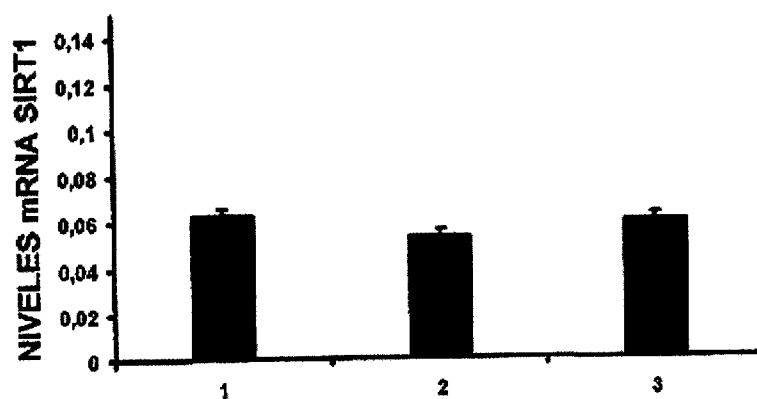
PROBIÓTICO**PLACEBO**

FIGURA 8

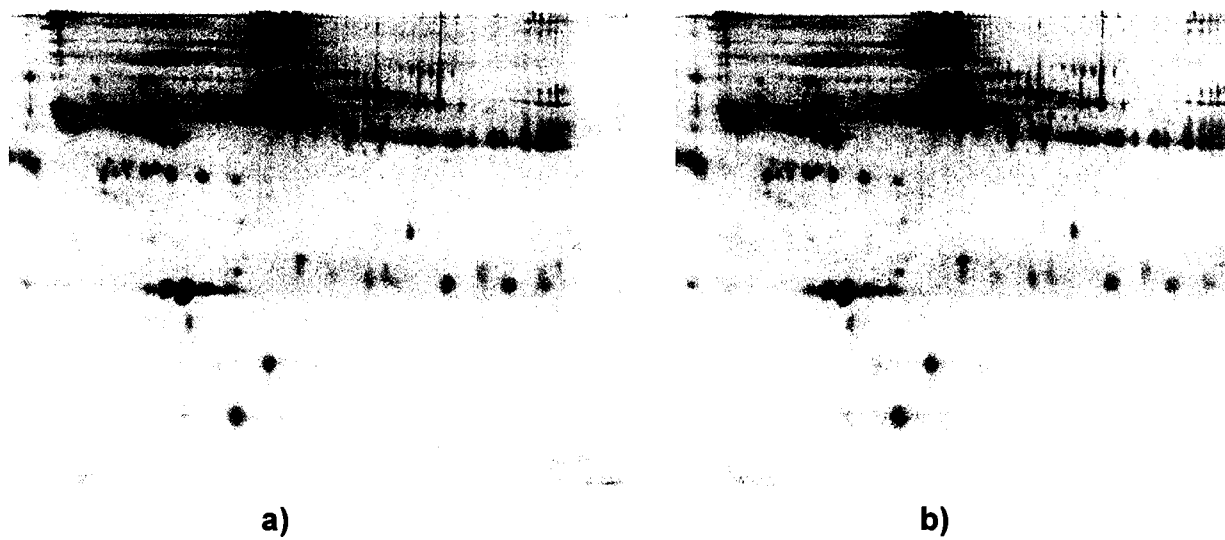


FIGURA 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/000329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A23C, A23L, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAKINO, S. et al., 'Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1', BRITISH JOURNAL OF NUTRITION, 2010 Oct, Vol.104, No. 7, pages 998-1006, ISSN: 0007-1145 (print), ISSN: 1475-2662 (electronic), Epub.: 21-05-2010, Results, Discussion.	1-4
X	WO 2008043161 A1 (BALTADJIEVA MARIA; DE LAS HERAS JOSE MIGUEL) 17-04-2008, claims.	1-4
X	WO 2008002484 A2 (LACPRO INDUSTRIES, LLC) 03-01-2008, claims 7-33.	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07/02/2012

Date of mailing of the international search report
(24/04/2012)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
J. Vizán Arroyo

Telephone No. 91 3498573

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/000329

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE202005009120U U1 (PETERIK JOSEF; PETERIK JAROSLAVA) 15-12-2005, Paragraph [0005], claim 1.	1-4
A	CANDORE, G. et al., 'Immunosenescence and anti-immunosenescence therapies: the case of probiotics', REJUVENATION RESEARCH, 2008, Vol. 11, No. 2, pages 425-432, ISSN: 1549-1684 (print), the whole document.	1-4
A	IBRAHIM, F. et al., 'Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier', FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, 2010 Jun, Vol. 59, No. 1, pages 53-59, ISSN: 0928-8244, the whole document.	1-4
A	MAÑÉ, J. et al., 'A mixture of Lactobacillus plantarum CECT 7315 and CECT 7316 enhances systemic immunity in elderly subjects. A dose-response, double-blind, placebo-controlled, randomized pilot trial.', NUTRICIÓN HOSPITALARIA: ORGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL, 2011 Jan-Feb, Vol. 26, No. 1, pages 228-235, ISSN: 1699-5198 (Electronic), the whole document.	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/000329

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2008043161 A	17.04.2008	BG109699 A EP2076139 AB EP20070719227 AT536102 T	30.04.2008 08.07.2009 14.03.2007 15.12.2011
----- WO2008002484 A	----- 03.01.2008	----- US2007298019 A US7901925 B US2007298018 A	----- 27.12.2007 08.03.2011 27.12.2007
----- DE202005009120 U	----- 10.11.2005	----- CZ16286 U	----- 15.03.2006
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/000329

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K35/74 (2006.01)

A23C9/127 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

C12R1/225 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2011/000329

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A23C, A23L, C12R

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	MAKINO, S. et al., 'Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1', BRITISH JOURNAL OF NUTRITION, 2010 Oct, Vol.104, No. 7, páginas 998-1006, ISSN: 0007-1145 (print), ISSN: 1475-2662 (electronic), Epub.: 21-05-2010, Resultados, Discusión.	1-4
X	WO 2008043161 A1 (BALTADJIEVA MARIA; DE LAS HERAS JOSE MIGUEL) 17-04-2008, Reivindicaciones.	1-4
X	WO 2008002484 A2 (LACPRO INDUSTRIES, LLC) 03-01-2008, Reivindicaciones 7-33.	1-4

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
07/02/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
24 de abril de 2012 (24/04/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Vizán Arroyo
Nº de teléfono 91 3498573

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/000329

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	DE202005009120U U1 (PETERIK JOSEF; PETERIK JAROSLAVA) 15-12-2005, Párrafo [0005], Reivindicación 1.	1-4
A	CANDORE, G. et al., 'Immunosenescence and anti-immunosenescence therapies: the case of probiotics', REJUVENATION RESEARCH, 2008, Vol. 11, No. 2, páginas 425-432, ISSN: 1549-1684 (print), todo el documento.	1-4
A	IBRAHIM, F. et al., 'Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier', FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, 2010 Jun, Vol. 59, No. 1, páginas 53-59, ISSN: 0928-8244, todo el documento.	1-4
A	MAÑÉ, J. et al., 'A mixture of Lactobacillus plantarum CECT 7315 and CECT 7316 enhances systemic immunity in elderly subjects. A dose-response, double-blind, placebo-controlled, randomized pilot trial.', NUTRICIÓN HOSPITALARIA: ORGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL, 2011 Jan-Feb, Vol. 26, No. 1, páginas 228-235, ISSN: 1699-5198 (Electronic), todo el documento.	1-4

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/000329

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2008043161 A	17.04.2008	BG109699 A EP2076139 AB EP20070719227 AT536102 T	30.04.2008 08.07.2009 14.03.2007 15.12.2011
----- WO2008002484 A	----- 03.01.2008	----- US2007298019 A US7901925 B US2007298018 A	----- 27.12.2007 08.03.2011 27.12.2007
----- DE202005009120 U	----- 10.11.2005	----- CZ16286 U	----- 15.03.2006
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K35/74 (2006.01)

A23C9/127 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

C12R1/225 (2006.01)