



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 290 008**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00900788 .1**

(86) Fecha de presentación : **17.01.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1143985**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2001**

(54) Título: **Uso de *Lactobacillus salivarius*.**

(30) Prioridad: **15.01.1999 IE 990033**
20.09.1999 IE 990782

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

(73) Titular/es: **Enterprise Ireland (trading as BioResearch Ireland)**
Glasnevin
Dublin 9, IE
University College Cork-National University of Ireland, Cork

(72) Inventor/es: **Collins, John Kevin;**
O'Sullivan, Gerald Christopher;
O'Mahony, Liam y
Shanahan, Fergus

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Uso de *Lactobacillus salivarius*.

5 Introducción

La invención se refiere al uso de cepas de *Lactobacillus salivarius*.

Los mecanismos de defensa para proteger el tracto gastrointestinal humano de la colonización por bacterias intestinales son altamente complejos e implican aspectos inmunológicos y no inmunológicos (V. J. McCracken y H. R. Gaskins, "Probiotics a critical review", Horizon Scientific Press, RU, 1999, pág. 278). Los mecanismos de defensa innatos incluyen el bajo pH del estómago, las sales biliares, el peristaltismo, las capas de mucina y los compuestos antimicrobianos tal como la lisozima (D. C. Savage, "Microbial Ecology of the Gut", Academic Press, Londres, 1997, pág. 278). Los mecanismos inmunológicos incluyen agregados linfoides especializados, células M subyacentes, denominadas placas de Peyer que se distribuyen a lo largo del intestino delgado y colon (M. F. Kagnoff. Gastroenterol. 1993, 105, 1275). Los antígenos luminales presentes en estos sitios dan como resultado la estimulación de subconjuntos de células T y B apropiados con el establecimiento de redes de citoquinas y la secreción de anticuerpos al tracto gastrointestinal (M. R. Neutra y J-P Kraehenbuhl, "Essentials of mucosal immunology", Academic Press, San Diego, 1996, pág. 29, M. E. Lamm. Ann. Rev. Microbiol. 1997, 51, 311). Además, puede suceder la presentación de antígenos mediante células epiteliales a linfocitos intraepiteliales y a las células inmunes de la lámina propia subyacente (S. Raychaudhuri *et al.* Nat Biotechnol., 1998, 16, 1025). Por lo tanto, el hospedador invierte sustancialmente en la defensa inmunológica del tracto gastrointestinal. Sin embargo, ya que la mucosa gastrointestinal es la mayor superficie por la que el hospedador interacciona con el entorno externo, los mecanismos de control específicos deben estar preparados para regular el grado de respuesta inmune a las 100 toneladas de alimento que maneja el tracto gastrointestinal a lo largo de una vida media (F. Shanahan, "Physiology of the gastrointestinal tract", Raven Press, 1994, pág. 643). Además, el intestino está colonizado por más de 500 especies de bacterias en un número de 10^{11} - 10^{12} /g en el colon. Por tanto, estos mecanismos de control tienen que ser capaces de distinguir bacterias adherentes no patógenas de patógenos invasivos que provocarían lesiones significativas en el hospedador. De hecho, la flora intestinal contribuye a la defensa del hospedador compitiendo con microorganismos recién ingeridos potencialmente patógenos.

30 El consumo de bacterias no patógenas, o probióticas, ha dado como resultado una potenciación de los parámetros inmunes en voluntarios sanos. Se proporcionan ejemplos de estos efectos moduladores inmunes en la Tabla 1.

35 TABLA 1
Efectos Potenciadores Inmunes Después del Consumo Oral de Bacterias Probióticas

	Efecto Observado	Referencia
40	Fagocitosis por Macrófagos Aumentada	10
45	Actividad de Células Asesinas Naturales Aumentada	11
50	Niveles Séricos de IFNy Aumentados	12
	Número de células B y células NK Aumentado	12
	Promoción de las respuestas de IgA	11, 13-15
	Respuestas de DTH Aumentadas	16

55 Las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal humano pueden promover la inflamación. Las respuestas inmunes aberrantes contra la microflora autóctona se han implicado en ciertos estados de enfermedad, tal como la enfermedad inflamatoria del intestino (Brandzeag P. *et al.* Springer Semin. Immunopathol., 1997, 18, 555). Los antígenos asociados a la flora normal conducen habitualmente a tolerancia inmunológica y un mecanismo principal de la inflamación de la mucosa es que se produzca un fallo al conseguir esta tolerancia (Stallmach A. *et al.*, Immunol. Today, 1998, 19, 438). La prueba de este fallo de la tolerancia incluye un aumento en los niveles de anticuerpos dirigidos contra la flora intestinal en pacientes con EII.

60 El documento WO-A-98/35014 describe cepas de *Lactobacillus salivarius* aisladas a partir de tracto gastrointestinal humano extirpado y lavado que inhibe un amplio intervalo de microorganismos Gram positivos y Gram negativos y que secreta un producto que tiene actividad antimicrobiana a un sobrenadante sin células.

Declaraciones de la invención

El sistema inmune está diseñado para defender el tejido del hospedador y destruir patógenos invasores. Después del reconocimiento de la presencia de una célula bacteriana, se activan las células del sistema inmune y eliminan la amenaza bacteriana. La producción de mediadores inflamatorios promueve la activación celular y la destrucción de patógenos.

Sorprendentemente, se ha observado que las cepas de *Lactobacillus salivarius* provocan un efecto antiinflamatorio *in vitro* e *in vivo*. Se ha observado que la percepción inmune de *Lactobacillus salivarius* da como resultado la supresión de actividad inflamatoria. El consumo deliberado de grandes cantidades de *Lactobacillus salivarius* da como resultado la supresión de actividad inflamatoria. La invención tiene, por lo tanto, un valor principal terapéutico potencial en la profilaxis o el tratamiento de respuestas inflamatorias indeseables, tal como la enfermedad inflamatoria del intestino.

Lactobacillus salivarius es un microorganismo comensal aislado originalmente de la flora microbiana del tracto gastrointestinal humano. El sistema inmune del tracto gastrointestinal no puede tener una reacción pronunciada contra miembros de su flora ya que la actividad inflamatoria resultante también destruiría las células hospedadoras y la función tisular. Por lo tanto, existe(n) algún(os) mecanismo(s) por los que el sistema inmune puede reconocer miembros comensales no patógenos de la flora gastrointestinal como diferentes de los organismos patógenos. Esto asegura que las lesiones a los tejidos del hospedador se restringen y que aún se mantenga una barrera defensiva.

De acuerdo con la invención se proporciona el uso de una cepa de *Lactobacillus salivarius* de origen humano en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de actividad inflamatoria indeseable.

La actividad inflamatoria indeseable de la invención puede ser actividad inflamatoria gastrointestinal indeseable tal como la enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, síndrome de intestino irritable, reservoritis o colitis post-infección.

La actividad inflamatoria puede deberse a cáncer gastrointestinal o a enfermedad inflamatoria sistémica tal como la artritis reumatoide.

En otro caso, la actividad inflamatoria indeseable puede deberse a un trastorno autoinmune.

En otro caso más, la actividad inflamatoria indeseable puede deberse a cáncer.

En una realización, la invención proporciona el uso de una cepa de *Lactobacillus salivarius* en la preparación de un medicamento para la profilaxis del cáncer.

En otra realización, la invención proporciona el uso de una cepa de *Lactobacillus salivarius* en la que el *Lactobacillus salivarius* está contenido en una formulación.

Preferiblemente, la formulación incluye otro material probiótico. Como alternativa o adicionalmente, la formulación incluye un material prebiótico.

De manera ideal, la formulación incluye un vehículo que se puede ingerir. El vehículo que se puede ingerir puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un comprimido, una cápsula o un polvo.

Preferiblemente, el vehículo que se puede ingerir es una proteína y/o un péptido, en particular proteínas y/o péptidos que son ricos en glutamina/glutamato; un lípido; un carbohidrato; una vitamina; un mineral y/o un oligoelemento.

Más preferiblemente, el vehículo que se puede ingerir es un producto alimenticio tales como leche acidificada, yogur, yogur congelado, leche en polvo, concentrado de leche, quesos para untar, aliños o bebidas.

En una realización, el *Lactobacillus salivarius* está presente en la formulación en más de 10⁶ ufc por gramo de sistema de suministro.

En otra realización, la formulación incluye un adyuvante. La formulación puede incluir un componente bacteriano. La formulación puede incluir, como alternativa o adicionalmente, una entidad farmacológica. La formulación también puede incluir un compuesto biológico.

En una realización, la invención proporciona el uso de una cepa de *Lactobacillus salivarius* en la preparación de un medicamento en el que la cepa o formulación es para la administración a animales. Preferiblemente, el animal es un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

En otra realización, la invención proporciona el uso de una cepa de *Lactobacillus salivarius* en la que el *Lactobacillus salivarius* efectúa cambios en un marcador inmunológico cuando se introduce en un sistema que comprende células que interactúan con el sistema inmune y células del sistema inmune.

ES 2 290 008 T3

Preferiblemente, las células que interactúan con el sistema inmune son células epiteliales. Más preferiblemente, el marcador inmunológico es una citoquina, especialmente $\text{TNF}\alpha$.

Preferiblemente, las células que interactúan con el sistema inmune y las células del sistema inmune son de origen coincidente.

En una realización, las células que interactúan con el sistema inmune son de origen gastrointestinal, respiratorio o genitourinario.

10 En otra realización, las células del sistema inmune son de origen gastrointestinal, respiratorio o genitourinario.

En una realización adicional, la invención proporciona el uso de una cepa de *Lactobacillus salivarius* en el que la cepa de *Lactobacillus salivarius* es *Lactobacillus salivarius* subespecie *salivarius*. Preferiblemente, el *Lactobacillus salivarius* es de tracto gastrointestinal humano extirpado y lavado.

15 Preferiblemente, el *Lactobacillus salivarius* inhibe un amplio intervalo de microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Más preferiblemente, secreta un producto que tiene actividad antimicrobiana en un sobrenadante sin células, produciéndose dicha actividad sólo por células en desarrollo y destruyéndose por proteinasa K y pronasa E.

20 Una cepa especialmente preferida de *Lactobacillus salivarius* es la cepa UCC 118 de *Lactobacillus salivarius*, o un mutante o variante de la misma.

25 Se realizó un depósito de *Lactobacillus salivarius* cepa UCC 118 en 1 NCIMB el 27 de noviembre de 1996 y se estableció el número de depósito NCIMB 40829. La cepa de *Lactobacillus salivarius* se describe en el documento WO-A-98/35014.

El *Lactobacillus salivarius* puede ser un mutante modificado genéticamente o puede ser una variante de origen natural de *Lactobacillus salivarius*.

30 Preferiblemente, el *Lactobacillus salivarius* está en forma de células viables. Como alternativa, el *Lactobacillus salivarius* puede estar en forma de células no viables.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 es un gráfico de los niveles de *C. perfringens* en los ratones que consumen UCC118 en comparación con un grupo placebo ($p < 0,05$). Los resultados se representan como los valores logarítmicos medios \pm desviación típica para cada uno de los grupos.

40 La figura 2 es un gráfico de barras de las puntuaciones inflamatorias para ratones que consumen UCC118 en comparación con ratones de control. Los resultados se muestran como la media \pm desviación típica para cada uno de los grupos.

45 La figura 3 es un gráfico de los niveles de $\text{TNF}\alpha$ a lo largo de seis semanas en las que pacientes consumen UCC118. Los resultados se representan como el nivel de pg/ml de $\text{TNF}\alpha$ medio en para cada momento ($n = 22$).

La figura 4 es un gráfico de las puntuaciones del CDAI para pacientes que consumen UCC118 durante el curso de una alimentación probiótica. Las puntuaciones del CDAI disminuyeron de una media de 180 a 160.

50 La figura 5 es un gráfico de la producción de citoquinas *in vitro* después de la exposición a UCC118. Los resultados se expresan como pg/ml.

La figura 6 es un gráfico de barras de niveles extracelulares de $\text{TNF}\alpha$, IL-1RA, IL-6, sIL-6R e IFN α después de la exposición a *Lactobacillus salivarius* UCC118.

55 La figura 7 es una serie de genes con secuencias de genes específicas para 268 citoquinas y moléculas relacionadas para examinar la respuesta inmune a UCC118. El panel inferior ilustra el cultivo de control mientras que el panel superior ilustra la expresión génica de citoquinas por PBMC después de la exposición a UCC118; y

La figura 8 es un gráfico de barras de los niveles de $\text{TNF}\alpha$ en presencia de diversas cepas bacterianas.

Descripción detallada

60 Se han desarrollado criterios para la selección *in vitro* de bacterias probióticas que reflejen determinados efectos *in vivo* en su hospedador, tales como modulación de la microflora del TGI y la modulación de la respuesta inmune de la mucosa, que de como resultado la producción de anticuerpos secretores específicos para la cepa consumida. Se ha descubierto que *Lactobacillus salivarius* subespecie *salivarius* UCC118 no sólo sobrevive al paso a través del tracto gastrointestinal y se adhiere a líneas celulares intestinales humanas sino que también, sorprendentemente, tiene efectos antiinflamatorios.

ES 2 290 008 T3

El uso general de bacterias probióticas es en forma de células viables. Sin embargo, también puede extenderse a células no viables tales como cultivos inactivados o composiciones que contienen factores beneficiosos expresados por las bacterias probióticas. Esto podría incluir microorganismos inactivados térmicamente o microorganismos inactivados por exposición a pH alterado o por sometimiento a presión. La preparación del producto es más simple con células no viables, ya que las células pueden incorporarse fácilmente en los compuestos farmacéuticos y los requerimientos de almacenamiento están mucho menos limitados que con células viables. *Lactobacillus casei* YIT 9018 ofrece un ejemplo del uso eficaz de células inactivadas por calor como un método para el tratamiento y/o la prevención del crecimiento tumoral como se describe en la Patente de EEUU Nº US4347240.

Se desconoce si se requieren bacterias intactas para ejercer un efecto antiinflamatorio o si pueden utilizarse solos los componentes individuales activos de la invención. Se han identificado componentes proinflamatorios de ciertas cepas bacterianas. Los efectos proinflamatorios de bacterias gram-negativas están mediados por lipopolisacáridos (LPS). El LPS solo induce una red proinflamatoria, en parte debido a la unión del LPS con el receptor CD14 en monocitos. Se asume que los componentes de bacterias probióticas poseen actividad antiinflamatoria debido a los efectos de toda la célula. Después del aislamiento de estos componentes, se prevé una manipulación de calidad farmacéutica.

La invención se entenderá más claramente a partir de los siguientes ejemplos.

20 Ejemplo 1

*Descripción detallada de la demostración *in vivo* de los efectos antiinflamatorios de *Lactobacillus salivarius*, especialmente subespecie *salivarius* UCC118*

25 *Modelo murino de inflamación gastrointestinal*

Se han implicado las respuestas inmunes aberrantes contra la microflora autóctona en ciertos estados de enfermedad, tal como la enfermedad inflamatoria del intestino (Brandzeag P., et al. Springer Semin. Immunopathol., 1997, 18, 555). Los antígenos asociados a la flora normal habitualmente conducen a tolerancia inmunológica y un mecanismo principal en la inflamación de la mucosa es que se produzca un fallo al conseguir esta tolerancia (Stallmach A., et al., Immunol. Today, 1998, 19, 438). La prueba de este fallo de la tolerancia incluye un aumento de los niveles de anticuerpos dirigidos contra la flora intestinal en pacientes con EII. Además, determinados modelos de ratón predisponentes a lesiones inflamatorias en el tracto gastrointestinal permanecen sin enfermedad cuando se alojan en condiciones sin gérmenes o cuando se tratan con antibióticos (Kuhn R., et al., Cell, 1993, 75, 263; Panwala C. M., et al. J. Immunol., 1998, 161, 5733).

Los ratones C57BL/6 knockout para interleucina-10 están predisponentes a desarrollar enterocolitis en presencia de una flora bacteriana entérica. Cuando se mantienen en condiciones sin gérmenes, los ratones knock out IL-10 no desarrollan la enfermedad (Kuhn R., et al. Cell, 1993, 75, 263). Ya que la patogénesis de esta enfermedad se ha vinculado con la flora entérica, la eliminación de componentes específicos de esta flora puede tener un efecto beneficioso sobre la gravedad de esta enfermedad.

45 *Lactobacillus salivarius* subespecie *salivarius* UCC118 es una bacteria probiótica que se aisló de un íleon humano sano. Es adecuada para la colonización gastrointestinal ya que cumple muchos criterios establecidos para la selección de cepas probióticas. Estos incluyen rasgos tales como tolerancia biliar, resistencia a ácidos y adherencia *in vitro* a líneas celulares colónicas humanas. Se realizaron ensayos de alimentación en humanos sanos y se observó una modificación considerable de la flora gastrointestinal. Además, el sistema inmune de la mucosa detectó UCC118 dando como resultado la producción y secreción de IgA específicas para UCC118.

50 De este modo, UCC118 sobrevive al paso a través del tracto gastrointestinal, modula la flora intestinal y es detectado por el sistema inmune de la mucosa. Se examinó la influencia de esta bacteria probiótica en la modulación de respuestas inflamatorias en el tracto gastrointestinal usando un modelo murino de enterocolitis. Además, se examinó el papel de *Lactobacillus salivarius* subespecie *salivarius* UCC118 en la disminución de la velocidad de cambio neoplásico en el tracto gastrointestinal.

55 Se estudiaron veinte ratones KO IL-10 (diez consumieron organismos probióticos en leche y 10 consumieron leche no modificada) durante 16 semanas. Se realizó un análisis microbiano fecal semanal para enumerar la excreción de lactobacilos, *Clostridium perfringens*, bacteroides, coliformes, bifidobacterias y enterococos. En el momento del sacrificio se evaluaron microbiológicamente e histológicamente el intestino delgado y el grueso.

60 Los niveles de coliformes y enterococos fecales disminuyeron significativamente en los animales de ensayo en comparación con los controles. En el momento del sacrificio, se observó una disminución significativa en el número de *C. perfringens* en los ratones de ensayo (figura 1). No hubo muertes en el grupo de ensayo en comparación con dos muertes por colitis fulminante en el grupo de control. Sólo un ratón del ensayo desarrolló adenocarcinoma de colon en comparación con cinco en el grupo de control. La inflamación de la mucosa en los animales de ensayo se puntuó sistemáticamente por debajo de la de los ratones de control (figura 2). La disminución de la incidencia de tumores después del consumo de UCC118 puede estar relacionada con el menor nivel de inflamación en el tracto gastrointestinal o puede deberse a la eliminación de miembros pro carcinógenos de la flora gastrointestinal (Rumney

ES 2 290 008 T3

C. J., et al. Carcinogenesis, 1993, 14, 79; Rowland I. R. (1995). En: Gibson G. R. (ed). Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology, págs. 155-174. Boca Raton CRC Press; Darveau D. Nat. Biotech., 1999, 17, 19).

- 5 En conclusión, el consumo de *Lactobacillus salivarius* UCC118 da como resultado una modulación significativa de la flora intestinal y una mejora de la tasa de mortalidad, la incidencia de cáncer y la puntuación de enfermedad.

Ejemplo 2

10 *Ensayo humano con UCC118 en pacientes con enfermedad de Crohn activa*

La enfermedad inflamatoria del intestino (IBD (EII)) abarca varios trastornos inflamatorios del tracto gastrointestinal, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

- 15 Se trajeron pacientes que padecían la enfermedad de Crohn activa con UCC118. En resumen, 22 pacientes consumieron UCC118 durante 6 semanas en un producto de leche fermentada. Se realizaron determinaciones microbiológicas e inmunológicas en la semana 0, la semana 1, la semana 3 y la semana 6. Esto no fue un ensayo controlado con placebo.

- 20 Se midieron varios niveles sistémicos de citoquinas en el transcurso de la alimentación. En particular, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), una citoquina proinflamatoria que se ha implicado en la patogénesis de muchos estados de enfermedad inflamatorios, incluyendo la enfermedad inflamatoria del intestino. Las terapias actuales para la enfermedad inflamatoria del intestino pretenden específicamente disminuir los niveles de TNF α (Present D. H., et al. New Eng. J. Med., 1999, 340, 1398). En este ensayo, los niveles sistémicos de TNF α disminuyeron después del consumo de UCC118 (figura 3).

Además, se evaluaron los pacientes respecto a su Índice de Actividad de Enfermedad de Crohn (CDAI) a lo largo del periodo de ensayo de seis semanas. Este índice evalúa la salud y el bienestar general de cada paciente (figura 4). En conjunto, el índice de actividad de la enfermedad mejoró ligeramente para la mayoría de los individuos del ensayo. Los mismos eran pacientes con enfermedad moderadamente activa y se esperaba que sus valores de CDAI aumentaran. Sin embargo, después del tratamiento con UCC118, los valores del CDAI no aumentaron y, de hecho, mejoraron desde una media de 180 a 160.

35 Ejemplo 3

Descripción detallada de la demostración *in vitro* de los mecanismos subyacentes a los efectos antiinflamatorios de *Lactobacillus salivarius*, especialmente subespecie *salivarius* UCC118

- 40 Se utilizaron varias metodologías para estos estudios incluyendo ELISA (determinación de proteína extracelular), citometría de flujo (determinación de proteína intracelular) y las series de expresión de ADNc (expresión de ARNm). En particular, se ha dirigido el examen de la expresión del factor de necrosis tumoral α , debido a su importancia clínica, y se ha observado la supresión de la producción de esta citoquina después de la exposición a UCC118 usando las tres metodologías.

- 45 Se midieron los niveles de citoquina extracelular por ELISA usando un sistema de ensayo transpocillo, con células epiteliales y células mononucleares de sangre periférica. Después de la coincubación con UCC118, la cantidad de TNF α producido disminuyó significativamente en comparación con los cultivos de control. Además, los niveles de IL-1RA e IFN γ cayeron mientras que los niveles de IL-6 y del receptor de IL-6 soluble aumentaron (figura 5). La tinción intracelular de TNF α confirmó el resultado del ELISA, ya que los niveles de TNF α eran menores en la muestra estimulada con UCC118 en comparación con los controles.

55 La figura 6 demuestra la señalización tricelular que se produce. La coincubación de PBMC y de cepa UCC118 de *Lactobacillus salivarius* da como resultado la estimulación de la producción de TNF α . Sin embargo, la co-incubación de PBMC, la cepa UCC118 de *Lactobacillus salivarius* y de células epiteliales (células CaCo-2) da como resultado una inhibición significativa de la producción de TNF α . Por tanto, el modelo tricelular se presenta un patrón de señalización significativamente diferente en comparación con bacterias y PBMC solas.

60 Las series de genes miden la cantidad de ARNm en una población de células. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica con UCC118 durante 24 horas y se examinó el efecto sobre la expresión de genes de citoquinas (figura 7). Se observó una modificación considerable de la expresión de genes de citoquinas. Por ejemplo, se silenciaron los genes que codifican las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α , mientras que se potenciaron los genes que codifican citoquinas de tipo Th2, tal como IL-6.

65 Los modelos *in vitro* han demostrado que la UCC118 es capaz de inducir citoquinas de tipo Th2 (es decir, IL-6 y receptor soluble de IL-6), mientras que suprime la producción de citoquinas inflamatorias tales como TNF α e IL-1 β . Por tanto, los resultados sugieren que el consumo de UCC118 sería beneficioso para pacientes que padecen enfermedades inflamatorias, tal como EII.

ES 2 290 008 T3

Ejemplo 4

Ensayo de cepas bacterianas antiinflamatorias

5 Se examinaron varias bacterias ácido lácticas que se aislaron del tracto gastrointestinal humano en este nuevo sistema de ensayo del efecto antiinflamatorio. Se obtuvieron todas las cepas bacterianas a partir de reservas en glicerol a -20°C, se incubaron en anaerobiosis durante una noche en caldo MRS y se lavaron con medio que contenía antibiótico. Se dejaron crecer monocapas de células epiteliales durante 6 semanas antes de la adición de PBMC y células bacterianas.

10 15 Pueden observarse los resultados de estas estimulaciones en la figura 8. Respecto a los cultivos de control, dos cepas bacterianas suprimieron la producción de TNF α . Las dos cepas de *Lactobacillus salivarius* cepa UCC118 que suprimieron la producción del TNF α son el objeto del documento WO-A-9835014. El *Bifidobacterium longum infantis* cepa UCC 35624 es el objeto de la Solicitud PCT presentada junto con la presente solicitud.

Inflamación

20 Inflamación es el término usado para describir la acumulación local de fluido, proteínas plasmáticas y glóbulos blancos en un sitio que ha sufrido una lesión física, una infección, o en el que hay una respuesta inmune en curso. Se ejerce control de la respuesta inflamatoria a varios niveles (para una revisión véase Henderson B., y Wilson M. 1998. En "Bacteria-Cytokine interactions in health and disease". Portland Press, 79-130). Los factores de control incluyen citoquinas, hormonas (por ejemplo, hidrocortisona), prostaglandinas, intermedios reactivos y leucotrienos. Las citoquinas son proteínas biológicamente activas de bajo peso molecular que están implicadas en la generación y el control de respuestas inmunológicas e inflamatorias, al tiempo que también regulan el desarrollo, la reparación tisular y la hematopoyesis. Proporcionan un medio de comunicación entre los propios leucocitos y también con otros tipos celulares. La mayoría de las citoquinas son pleiotrópicas y expresan múltiples actividades biológicamente solapantes. Son las cascadas y las redes de citoquinas las que controlan la respuesta inflamatoria más que la acción de una citoquina particular sobre un tipo celular particular (Arai KI, et al., Annu Rev Biochem 1990; 59: 783-836). La disminución de la respuesta inflamatoria da como resultado menores concentraciones de las señales de activación apropiadas y de otros mediadores inflamatorios conduciendo al cese de la respuesta inflamatoria. El TNF α es una citoquina proinflamatoria fundamental ya que inicia una cascada de citoquinas y los efectos biológicos que dan como resultado el estado inflamatorio. Por lo tanto, los agentes que inhiben el TNF α se usan actualmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, Infliximab (Marca Registrada).

30 35 Se piensa que las citoquinas proinflamatorias desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias, incluyendo la enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Las terapias actuales para el tratamiento de la EII pretenden disminuir los niveles de estas citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-8 y TNF α . Tales terapias también pueden desempeñar un papel significativo en el tratamiento de enfermedades inflamatorias sistémicas, tal como artritis reumatoide.

40 En vista de las propiedades antiinflamatorias de *Lactobacillus salivarius* que se han descubierto, estas cepas pueden tener una aplicación potencial en el tratamiento de una variedad de enfermedades inflamatorias, particularmente si se usan en combinación con otras terapias antiinflamatorias, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o Infliximab (Marca Registrada).

Enfermedad Autoinmune

45 50 55 El sistema inmune tiene un gran repertorio de especificidades expresadas por células B y T. Algunas de estas especificidades se dirigirán contra componentes propios. El auto-reconocimiento normalmente se controla por delección e inactivación clonal de linfocitos aurorreactivos. Sin embargo, hay un fondo constante de autoinmunidad con anticuerpos contra muchas proteínas encontradas en suero. La autoinmunidad se produce por un fallo en el sistema de reconocimiento de antígenos propios-extráños. Cuando sucede una enfermedad autoinmune, la respuesta inmune resultante lesiona el tejido que lleva el antígeno responsable. Los mecanismos más importantes mediante los cuales suceden los daños inmunopatológicos son el depósito de inmunocomplejos, la hipersensibilidad tipo II y las reacciones mediadas por células. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, diabetes mellitus insulino-dependiente, miastenia grave y anemia perniciosa. Se ha observado que *Lactobacillus salivarius* es una bacteria inmunomoduladora. Por tanto, el consumo como componente único o en combinación con otras bacterias por pacientes que padecen enfermedades autoinmunes puede limitar las lesiones de órganos y ayudar a restaurar la homeostasis corporal normal.

Inflamación y Cáncer

60 65 La producción de citoquinas multifuncionales por un amplio espectro de tipos tumorales sugiere que se están produciendo respuestas inflamatorias significativas en pacientes con cáncer. Actualmente no está claro qué efecto protector tiene esta respuesta contra el crecimiento y desarrollo de las células tumorales *in vivo*. Sin embargo, estas respuestas inflamatorias podrían afectar negativamente al hospedador que lleva el tumor. Están implicadas complejas interacciones de citoquinas en la regulación de la producción de citoquinas y la proliferación celular en los tejidos tumorales y normales (McGee D. W., et al., Immunology 1995 sept; 86 (1): 6-11, Wu S., et al., Gynecol Oncol

ES 2 290 008 T3

1994 abril; 53 (1): 59-63). Durante mucho tiempo se ha reconocido que la pérdida de peso (caquexia) es la causa única más común de muerte en pacientes con cáncer (Inagaki J., *et al.*, Cancer 1974 feb; 33 (2): 568-73) y una malnutrición inicial indica un mal pronóstico (Van Eys J. Nutr Rev 1982 dic; 40 (12): 353-9). Para que un tumor pueda crecer y extenderse debe inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos y degradar la matriz extracelular. La respuesta inflamatoria puede tener que desempeñar papeles significativos en los anteriores mecanismos, contribuyendo de este modo al deterioro del hospedador y a la progresión del tumor. Debido a las propiedades antiinflamatorias de *Lactobacillus salivarius*, estas cepas bacterianas pueden reducir la velocidad de transformación de células malignas. Además, las bacterias intestinales pueden producir, a partir de los compuestos de la dieta, sustancias con actividad genotóxica, carcinógena y promotora de tumores, y las bacterias del intestino pueden activar procarcinógenos a agentes reactivos con el ADN (Rowland I. R. (1995). Toxicology of the colon: role of the intestinal microflora. En: Gibson G. R. (ed) Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology, págs. 155-174. Boca Raton CRC Press). En general, las especies de *Lactobacillus* tienen bajas actividades de enzimas metabolizantes de xenobióticos en comparación con otras poblaciones del intestino, tales como bacteroides, eubacterias y clostridios (Saito Y., *et al.*, Microb. Ecol. Health Dis., 1992; 5, 105-110). Por lo tanto, aumentar el número de bacterias *Lactobacillus* en el intestino podría modificar beneficiosamente los niveles de estas enzimas.

Prebióticos

La introducción de organismos probióticos se consigue mediante la ingesta del microorganismo en un vehículo adecuado. Sería ventajoso proporcionar un medio que promoviera el crecimiento de estas cepas probióticas en el intestino grueso. La adición de uno o más oligosacáridos, polisacáridos u otros prebióticos potencia el desarrollo de bacterias ácido lácticas en el tracto gastrointestinal (Gibson, G. R. Br. J. Nutr. 1998; 80 (4): S209-12). Los prebióticos se refieren a cualquier componente alimenticio no viable que fermenta específicamente en el colon por bacterias autóctonas que se piensa que tienen un valor positivo, por ejemplo, bifidobacterias, lactobacilos. Los tipos de prebióticos pueden incluir los que contienen fructosa, xilosa, soja, galactosa, glucosa y manosa. La administración combinada de una cepa probiótica con uno o más compuestos prebióticos puede potenciar el desarrollo del probiótico administrado *in vivo*, dando como resultado un beneficio para la salud más pronunciado, y se denomina simbiótico.

Otros ingredientes activos

Se apreciará que el *Lactobacillus salivarius* puede administrarse de manera profiláctica o como un método de tratamiento solo o con otros materiales probióticos y/o prebióticos como se ha descrito anteriormente. Además, las bacterias pueden usarse como parte de un régimen profiláctico o de tratamiento, usando otros materiales activos tales como los usados para tratar inflamación u otros trastornos, especialmente los del tracto gastrointestinal. Pueden administrarse tales combinaciones como una formulación única o como formulaciones separadas administradas al mismo tiempo o en momentos diferentes, y usando la misma o diferentes vías de administración.

La invención no se limita a las realizaciones que se han descrito anteriormente en este documento, ya que pueden variar en los detalles.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un uso de una cepa de *Lactobacillus salivarius* de origen humano en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una actividad inflamatoria indeseable.
- 5 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad inflamatoria indeseable es una actividad inflamatoria gastrointestinal indeseable.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la actividad inflamatoria gastrointestinal es enfermedad inflamatoria del intestino.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la actividad inflamatoria gastrointestinal es la enfermedad de Crohn.
- 15 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la actividad gastrointestinal es colitis ulcerosa.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la actividad inflamatoria gastrointestinal es el síndrome de intestino irritable.
- 20 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la actividad inflamatoria gastrointestinal es reservoritis.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la actividad inflamatoria gastrointestinal es colitis post-infección.
- 25 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la actividad inflamatoria se debe a cáncer gastrointestinal.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad inflamatoria es enfermedad inflamatoria sistémica.
- 30 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enfermedad inflamatoria sistémica es artritis reumatoide.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la actividad inflamatoria indeseable se debe a un trastorno autoinmune.
- 35 13. El uso de acuerdo con la reivindicación, en el que la actividad inflamatoria indeseable se debe a cáncer.
14. Un uso de una cepa de *Lactobacillus salivarius* en la preparación de un medicamento para la profilaxis de cáncer.
- 40 15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el *Lactobacillus salivarius* está contenido en una formulación.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la formulación incluye otro material probiótico.
- 45 17. El uso de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16, en el que la formulación incluye un material prebiótico.
18. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que la formulación incluye un vehículo que se puede ingerir, preferiblemente el vehículo que se puede ingerir es un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un comprimido, una cápsula o un polvo.
- 50 19. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que el vehículo que se puede ingerir es una proteína y/o un péptido, en particular proteínas y/o péptidos que son ricos en glutamina/glutamato; un lípido; un carbohidrato; una vitamina; un mineral y/o un oligoelemento.
- 55 20. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el vehículo que se puede ingerir es un producto alimenticio tales como leche acidificada, yogur, yogur congelado, leche en polvo, concentrado de leche, quesos para untar, aliños o bebidas.
- 60 21. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que el *Lactobacillus salivarius* está presente en más de 10^6 ufc por gramo de sistema de suministro.
22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en el que la formulación incluye uno cualquiera o más de un adyuvante, componentes bacterianos, una entidad farmacológica o un compuesto biológico.
- 65 23. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa o formulación es para administración a animales.

ES 2 290 008 T3

24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el animal es un mamífero, preferiblemente un ser humano.
25. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el *Lactobacillus salivarius* produce cambios en un marcador immunológico cuando se introduce en un sistema que comprende células que interactúan con el sistema inmune y células del sistema inmune.
26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, en el que las células que interactúan con el sistema inmune son células epiteliales.
- 10 27. El uso de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, en el que el marcador immunológico es una citoquina, preferiblemente la citoquina es TNF α .
- 15 28. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en el que las células que interactúan con el sistema inmune y las células del sistema inmune son de origen coincidente.
- 15 29. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en el que las células que interactúan con el sistema inmune son de origen gastrointestinal, respiratorio o genitourinario.
- 20 30. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, en el que las células del sistema inmune son de origen gastrointestinal, respiratorio o genitourinario.
31. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa de *Lactobacillus salivarius* es *Lactobacillus salivarius* subespecie *salivarius*.
- 25 32. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el *Lactobacillus salivarius* se aísla a partir de tracto gastrointestinal humano extirpado y lavado.
- 30 33. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el *Lactobacillus salivarius* inhibe un gran intervalo de microorganismos Gram positivos y Gram negativos.
34. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que *Lactobacillus salivarius* secreta un producto que tiene actividad antimicrobiana en un sobrenadante sin células, produciéndose dicha actividad sólo por células en desarrollo y destruyéndose por proteinasa K y pronasa E.
- 35 35. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa de *Lactobacillus salivarius* es la cepa UCC 118 [NCIMB40829] o un mutante o variante de la misma.
36. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el *Lactobacillus salivarius* es un mutante modificado genéticamente.
- 40 37. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el *Lactobacillus salivarius* es una variante de origen natural de *Lactobacillus salivarius*.
- 45 38. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el *Lactobacillus salivarius* está en forma de células viables.
39. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el *Lactobacillus salivarius* está en forma de células no viables.

50

55

60

65

ES 2 290 008 T3

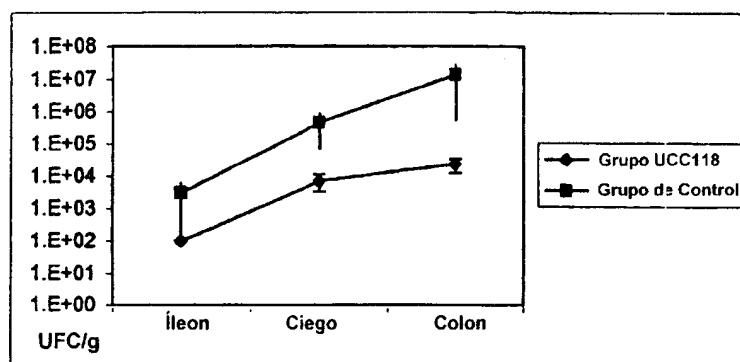


Fig. 1

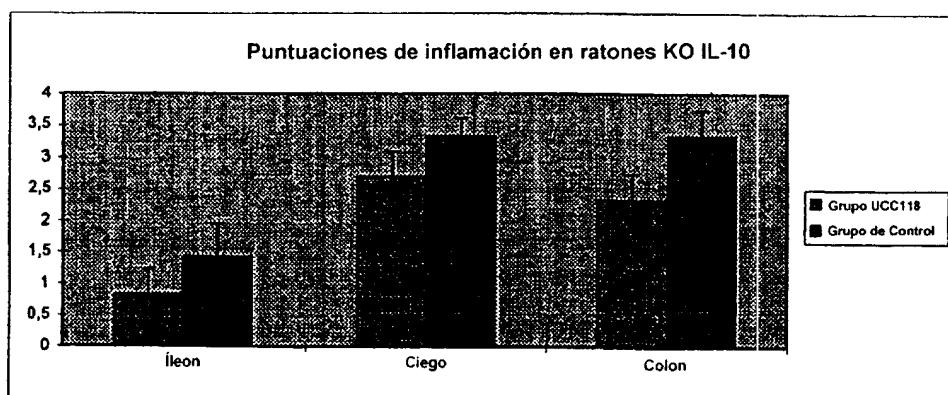


Fig. 2

ES 2 290 008 T3

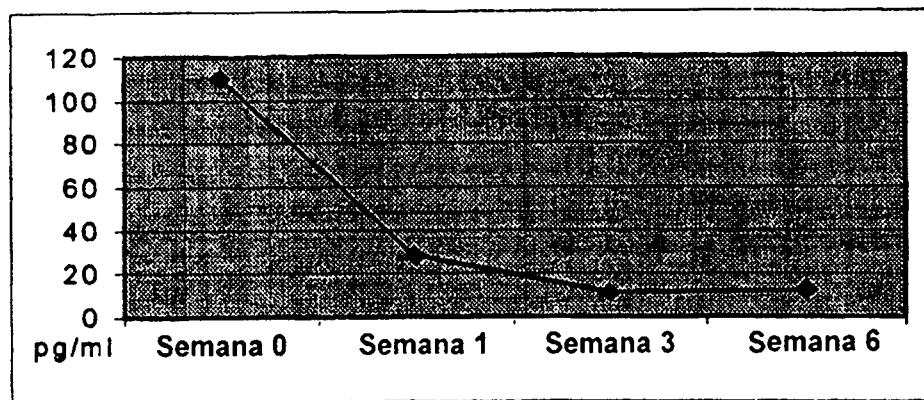


Fig. 3

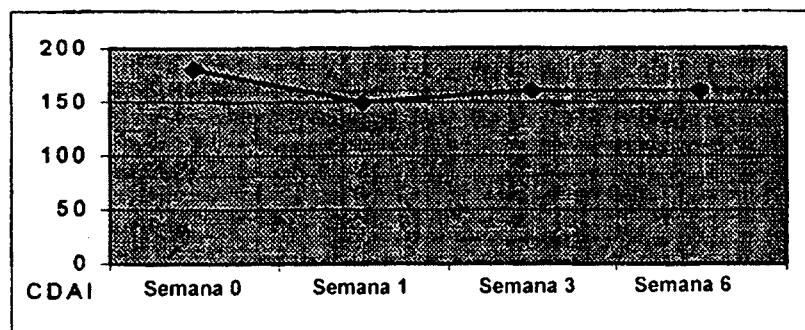


Fig. 4

ES 2 290 008 T3

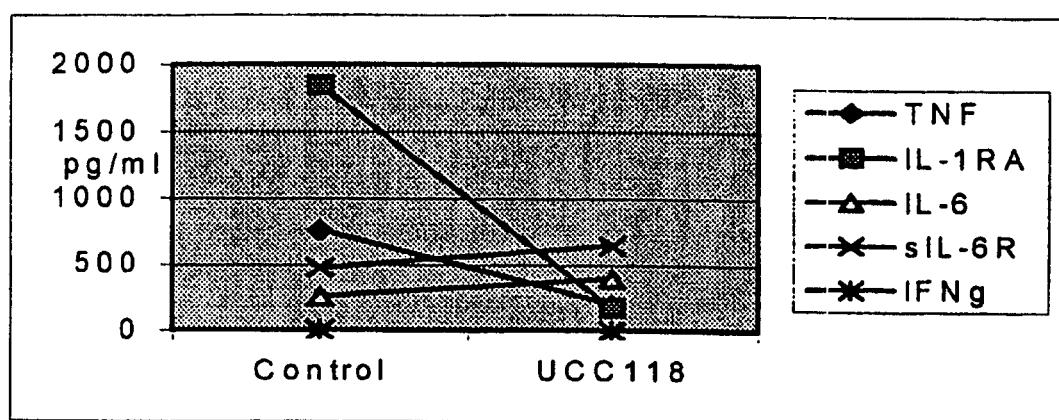


Fig. 5

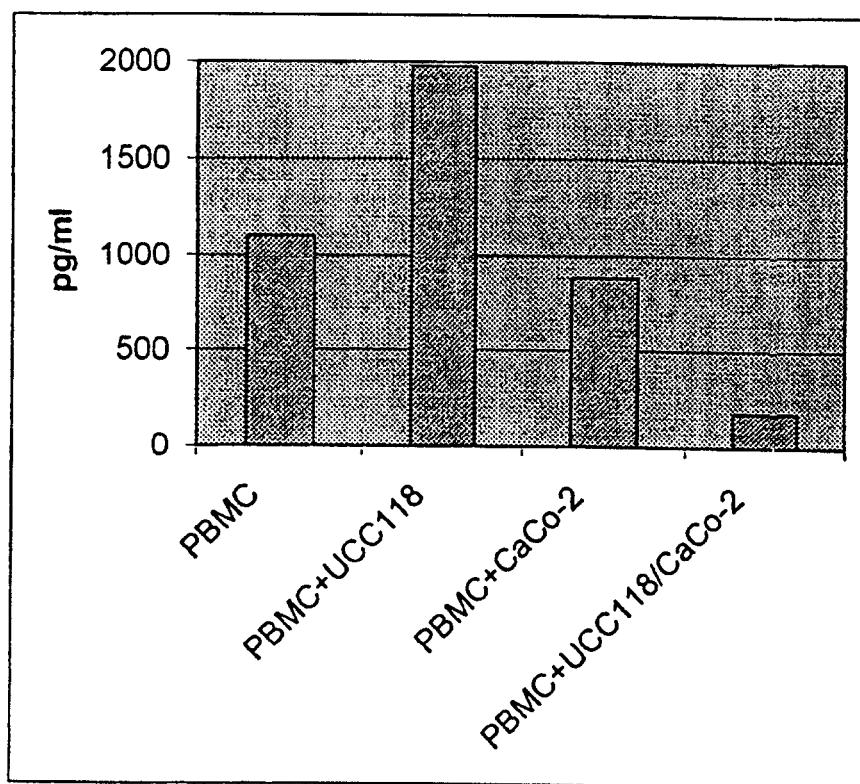


Fig. 6

ES 2 290 008 T3

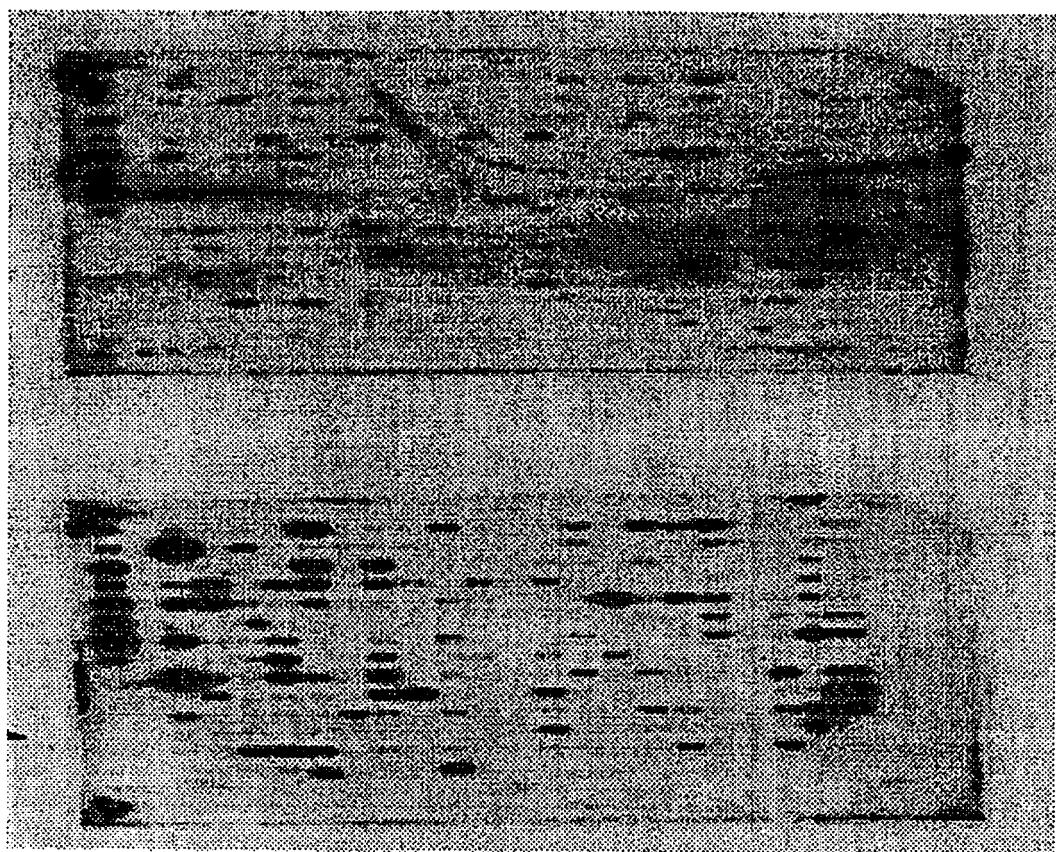


Fig. 7

ES 2 290 008 T3

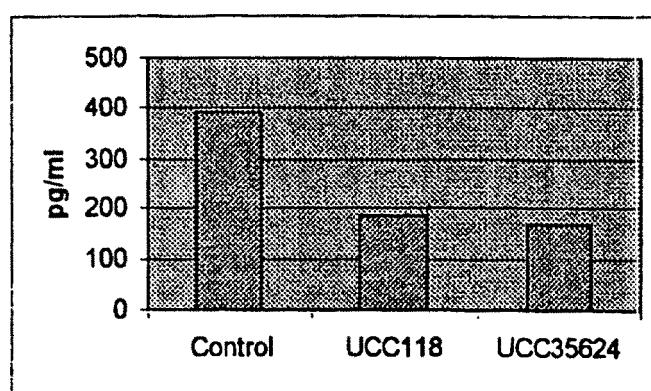


Fig. 8