

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 398**

51 Int. Cl.:

A61P 1/00	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)
A61P 37/08	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)
A61K 35/745	(2015.01)
A61K 35/747	(2015.01)
A61P 17/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2017 PCT/EP2017/068131**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.01.2018 WO18015388**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2017 E 17737847 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021 EP 3484585**

54 Título: **Uso de probióticos en el tratamiento y/o la prevención de la dermatitis atópica**

30 Prioridad:

18.07.2016 EP 16382342

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

11.10.2021

73 Titular/es:

**BIONOU RESEARCH, S.L. (50.0%)
Avda. Capiscol, N° 3
03550 Sant Joan d'Alacant (Alicante), ES y
BIOPOLIS, S.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NAVARRO LÓPEZ, VICENTE MANUEL;
RAMÍREZ BOSCA, ANA ADELA;
PÉREZ ORQUÍN, JOSÉ MANUEL;
RAMÓN VIDAL, DANIEL;
GENOVÉS MARTÍNEZ, SALVADOR;
CHENOLL CUADROS, MARÍA EMPAR y
CODOÑER CORTÉS, FRANCISCO MANUEL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 863 398 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de probióticos en el tratamiento y/o la prevención de la dermatitis atópica

- 5 La presente invención se refiere a una composición probiótica y a su empleo para el tratamiento y/o la prevención de la dermatitis atópica. Por tanto, la presente invención se podría encuadrar en el campo de la medicina, en particular, en el tratamiento de las enfermedades cutáneas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 La dermatitis atópica (DA) es una dermatosis inflamatoria, prurítica, de curso crónico, caracterizada por el desarrollo de lesiones de eczema con un patrón de distribución característico que afecta a pacientes que presentan una hiperreactividad cutánea frente a diversos factores ambientales que son inocuos para los pacientes no atópicos. Los
15 pacientes atópicos con frecuencia refieren antecedentes personales o familiares asma o rinitis alérgica o DA, y presentan niveles séricos de IgE elevados. La DA afecta con mayor frecuencia a la infancia, pero que puede persistir y/o debutar en la adolescencia o en la edad adulta.

- La prevalencia de la DA se sitúa entre el 4 y el 20% de la población. Existen grandes diferencias según el medio sea rural o urbano donde la incidencia es más alta. La incidencia está en aumento probablemente por las siguientes
20 causas: estilo de vida occidental, aumento de la edad materna, polución, tabaquismo materno y reducción de la lactancia materna. El 45% de los niños desarrollan la DA en los primeros seis meses de vida y el 85% en los primeros cinco años. En aquellos que inician su enfermedad antes de los dos años, el 20% tienen persistencia de los síntomas a los siete años.

- 25 Si bien la DA se expresa clínicamente con una manifestación que es el eczema, tanto en su forma aguda como crónica, esta enfermedad presenta una gran variabilidad en 1) el espectro de las manifestaciones clínicas, 2) en las bases genéticas de la misma y 3) en los mecanismos patogénicos que subyacen a las manifestaciones clínicas.

- 30 Una de las hipótesis más generalizada para explicar el origen de la DA es suponer que se trate de una manifestación más, en este caso cutánea, de un proceso sistémico que abarca a otros órganos y sistemas del cuerpo humano, dando un espectro de síntomas como el asma, la alergia alimenticia y la rinitis alérgica, entre otros. De hecho, un porcentaje elevado de pacientes con estas patologías presentan una elevación de los niveles de IgE y eosinófilos en sangre periférica sin quedar claro el origen de ello ni la implicación clínica que esto tiene.

- 35 En cuanto a los mecanismos fisiopatológicos, se cree que la respuesta inmunológica juega un papel primordial en su origen. De hecho, datos recientes implican a las células cutáneas dendríticas (células presentadoras de antígenos) y a la regulación de las señales inmunes-inflamatorias mediadas por linfocitos Th2 en el origen de la DA. Los datos indican que estos mecanismos inmunológicos, que implican tanto a las células dendríticas cutáneas presentadoras de antígenos como a la regulación inmune y señales inflamatorias mediadas por linfocitos Th2, están en el origen
40 fisiopatológico de la DA. Lo que no es conocido en la actualidad es el origen de ese estímulo en el inicio de la cascada inmunológica que acontece en la DA.

- La enfermedad presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas que oscilan desde formas menores como el eccema de las manos hasta formas mayores como sería el caso del *rash* eritrodérmico. No existen cambios
45 específicos del tipo anatomopatológico ni de laboratorio, por lo que el diagnóstico de la DA es clínico y los criterios de Hanifin-Rajka (Hanifin JM, *et al.* Acta Derm Venereol 1980;92:44-7) continúan siendo el estándar para su diagnóstico.

- Las características clínicas de la DA son variables en relación con la edad y son las incluidas en los criterios
50 diagnósticos, incluyendo el prurito, las lesiones de eczema y lesiones de rascado.

- Prurito: uno de los hallazgos más importantes y constantes de la atopia. El prurito de los atópicos es intenso y generalmente cursa a brotes. El prurito hace que los pacientes se autoinduzcan lesiones por el rascado. Si bien la
55 causa del prurito no está bien determinada, parece ser debida a la liberación de mediadores inflamatorios y citocinas.

- Eczema: las lesiones de eczema pueden ser agudas y crónicas. Las lesiones agudas se caracterizan por máculas, pápulas y placas eritematosas, vesiculosa, exudativas y muy pruriginosas. El rascado y las escoriaciones repetidas dan lugar a las lesiones crónicas, que se caracterizan por acompañarse de marcado engrosamiento cutáneo con
60 evidente liquenificación y presencia de pápulas secas y fibrosas.

Liquenificación: es característico la observación de lesiones cutáneas liquenificadas, consistiendo en placas poco delimitadas en las que existe un engrosamiento cutáneo con marcada visualización de los pliegues y líneas cutáneas.

Prurigo: pequeñas pápulas con una discreta vesícula, con marcada excoriación que son resultado del rascado vigoroso.

5 Dermatitis exfoliativa: en casos de atopía extensa pueden mostrarse clínicamente como una dermatitis exfoliativa generalizada teniéndose que incluir en el diagnóstico diferencial de las eritrodermias.

Otro aspecto distinto al del establecimiento del diagnóstico es la medida o cuantificación de la gravedad del proceso. Con este fin se han desarrollado diversos métodos y criterios que sirven para valorar la severidad y monitorizar la respuesta al tratamiento, tanto en ensayos clínicos como en estudios observacionales e incluso en la práctica asistencial, cuando en ésta se pretende objetivar la evolución del paciente con mayor precisión que la aportada por la percepción subjetiva del paciente, su cuidador o su médico. En este sentido, el método más validado y utilizado es la escala compuesta denominada índice SCORAD (*Scoring Atopic Dermatitis*), desarrollado por el grupo *European Task Force on Atopic Dermatitis* en el año 1993 (*European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Dermatology 1993; 186:23-31*). Ha demostrado ser el mejor método de valoración de la severidad de la dermatitis atópica en estudios comparativos y el más ampliamente documentado sobre su validez, reproducibilidad, sensibilidad y aceptabilidad. El SCORAD consiste en un sistema de puntuación que tiene en cuenta la extensión y la intensidad de cinco tipos de lesiones fundamentales de la DA (eritema, edema/pápula, exudado/costra, escoriación y liquenificación), así como los síntomas de la misma (prurito y pérdida de sueño).

20 Existe cierta discrepancia sobre los valores del índice SCORAD que delimitan los diferentes grados de gravedad. Para algunos grupos españoles se considera leve, moderado o grave el cuadro que obtiene puntuaciones en el índice SCORAD <25, de 25 a 40 o >40, respectivamente, mientras que otros autores, basándose en correlaciones con pruebas de laboratorio, utilizan las puntuaciones de <20, de 20 a 40 o >40, para delimitar respectivamente los cuadros leves, moderados y graves.

El tratamiento de la DA está consensuado y se basa, en primera instancia, en evitar el prurito y en eliminar la lesión inflamatoria; y, en segunda instancia, en prevenir recaídas (Muñoz F. 2002. *JANO*, 1432: 52-7; Boguniewicz M, Schmid-Grendelmeier P, and Leung DYM. 2006. *J Allergy Clin Immunol*, 118: 40-3). Para eliminar el prurito y el rascado provocado por él, se utilizan antihistamínicos H1, aunque su efectividad no está claramente demostrada. La finalidad primordial del tratamiento del eczema es el control de la lesión inflamatoria, que secundariamente ayuda a controlar el prurito. Por este motivo se utilizan corticosteroides tópicos de distinta potencia en función de la severidad de la lesión y de la situación del paciente. Los que parecen presentar mejores resultados son los antihistamínicos H1 clásicos, que producen sedación (hidroxicina, clemastina, dexclorfeniramina), y los antihistamínicos H1 de más reciente desarrollo (desfenfluramina, loratadina, cetirizina, y derivados), con menor efecto sedante pero con resultados que, en ocasiones, no presentan diferencias estadísticamente significativas frente al placebo (Boguniewicz M, et al 2006. Citado *ad supra*).

Los efectos adversos de los corticosteroides tópicos plantean restricciones para su empleo. Las reacciones adversas en el lugar de administración son las más comunes. Si se aplican periocularmente, suele aparecer atrofia cutánea, Petequias, estrías atróficas, hipertrichosis, despigmentación, telangiectasias, foliculitis y glaucoma. También se han descrito, con mucha menor frecuencia, efectos adversos sistémicos de mayor gravedad como la supresión del eje hipotalámico-hipofiso-suprarrenal, retraso del crecimiento o manifestaciones cushingoides.

Los efectos adversos de los corticosteroides y la falta de respuesta a los mismos en algunos pacientes han promovido el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de la inflamación. Entre los mejor estudiados se encuentran los inhibidores de calcineurina (tacrolimus y pimecrolimus) en administración tópica (Leung, DYM. and Bleder, T. 2003, *Lancet*, 361: 151-60; Muñoz, F. 2002, *JANO*, 1432: 52-7). Ahora bien, aún existen dudas sobre la seguridad de estos medicamentos en tratamientos a largo plazo. De hecho, las fichas técnicas de los productos que contienen tacrolimus o pimecrolimus para el tratamiento tópico de la dermatitis atópica indican que sólo deben aplicarse en niños mayores de dos años en los que no se aconseja el uso de corticosteroides tópicos o éstos han fracasado previamente.

El uso de probióticos en el tratamiento de la DA se ha estudiado en los últimos años en un número limitado de estudios piloto con resultados dispares dependiendo del probiótico utilizado y de la edad de los pacientes incluidos en el estudio (Soo-Pk Kim, et al. 2014. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 113: 217e226; Gerasimov, SV et al. 2010. *Am J Clin Dermatol*, 11:351e361; Farid, R. et al. 2011. *Iran J Pediatr*. 21:225e230) Los estudios más recientes, incluyendo un metaanálisis de las publicaciones previas, demuestran un efecto beneficioso del uso de probióticos en determinadas circunstancias relacionadas con la edad, la cepa o la combinación de probióticos utilizada y la dosis (Farid, R. et al 2011 cited *ad supra*; Van del Aa LB, et al. 2010. *Clin Exp Allergy*. 40:795e804; Boyle, RJ et al. 2008. *Cochrane Database Syst Rev*, 4: CD006135; Lee, J. et al. 2008. *J Allergy Clin Immunol*. 121:116). Los probióticos más estudiados en DA en términos de tratamiento de la enfermedad y de prevención de nuevos brotes de DA pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, ya que son los que parecen rendir mejores resultados (Lee, J. et al. 2008. Citado *ad supra*).

Hay una necesidad médica bien establecida de desarrollar tratamientos de calidad, seguros y eficaces a largo plazo para el tratamiento de la DA, ya que la DA afecta a una parte importante de la población, con consecuencias remarcables sobre su calidad de vida que puede verse afectada de complicaciones médicas, etc. Los corticosteroides tópicos se consideran un tratamiento muy eficaz, pero con elevado riesgo de efectos adversos. La incorporación de nuevas alternativas a los corticosteroides tópicos (como los inhibidores de calcineurinas) responde a esta necesidad, aunque el riesgo de efectos adversos con estos nuevos medicamentos está aún por definir. En consecuencia, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar nuevas composiciones útiles en el tratamiento de la DA, que demuestren ser efectivas y que no ocasionen en el paciente los efectos secundarios típicos de los fármacos utilizados hasta la fecha.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto que la administración a un individuo que padece dermatitis atópica de una composición probiótica que modifica la microbiota intestinal junto a su tratamiento crónico habitual permite, sorprendentemente, la remisión y/o la mejora de la evolución de los brotes de dermatitis atópica en el individuo. Tal y como se muestra en los ejemplos que acompañan a la presente descripción, cuando la composición probiótica (que comprende microorganismos de los generos *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) fue administrada junto al tratamiento crónico habitual a pacientes con brotes de dermatitis atópica, se observó una mejoría del índice SCORAD del 82,36% mientras que la mejoría de este índice en los casos tratados con el tratamiento crónico habitual pero sin la composición probiótica fue del 28,4%, diferencias que se consideran clínica y estadísticamente significativas. Además, la mejora producida por la composición probiótica ocurrió desde el primer mes de la ingesta, manteniéndose o aumentando las diferencias en ulteriores análisis correspondientes a los meses 2 y 3 del tratamiento. Adicionalmente, otra de las ventajas del tratamiento de la DA mediante la composición probiótica de la invención es que el consumo de corticoides en el grupo tratado con dicha composición probiótica fue menor que en el grupo que recibió el placebo.

Además de este efecto beneficioso sobre la evolución de la enfermedad en pacientes con DA, también se observó que en los tres meses posteriores a la suspensión del tratamiento con la composición probiótica anteriormente referida, los individuos que habían recibido el tratamiento con dicha composición tenían un menor número de brotes y un tiempo libre de enfermedad mayor que aquellos pacientes que no habían recibido el tratamiento. De este modo queda demostrada la utilidad de la composición probiótica descrita en la presente invención para el tratamiento y/o la prevención de la DA.

Los inventores han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

Composición probiótica de la invención y su uso en el tratamiento y/o la prevención de la DA

En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición probiótica que comprende microorganismos de *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* (de aquí en adelante *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus casei*.

En la presente invención se entiende por "composición probiótica" aquella composición que comprende, al menos, un microorganismo que, cuando es ingerido, interacciona con el metabolismo del individuo y produce un efecto beneficioso en él. En la presente invención, la composición probiótica comprende los microorganismos *B. lactis*, *B. longum* y *L. casei*, de aquí en adelante, "composición probiótica de la invención".

B. lactis es una bacteria usada habitualmente como probiótico, que se encuentra mayoritariamente en el yogur y otros productos lácteos, incluidas las leches infantiles. La clasificación científica de *B. lactis* es: Reino: *Bacteria*, División: *Firmicutes*, Clase: *Actinobacteria*, Orden: *Bifidobacteriales*, Familia: *Bifidobacteriaceae*, Género: *Bifidobacterium*, Especie: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

L. casei es una bacteria usada habitualmente como probiótico, que se encuentra mayoritariamente en el yogur y otros productos lácteos, incluidas las leches infantiles. La clasificación científica de *L. casei* es: Reino: *Bacteria*, División: *Firmicutes*, Clase: *Bacilli*, Orden: *Lactobacillales*, Familia: *Lactobacillaceae*, Género: *Lactobacillus*, Especie: *Lactobacillus casei*.

Por otro lado, *B. longum* es una bacteria Gram negativa, catalasa-negativa, con forma redondeada, que se encuentra en el tracto gastrointestinal, donde produce ácido láctico. La clasificación científica de *B. longum* es: Reino: *Bacteria*, División: *Firmicutes*, Clase: *Actinobacteria*, Orden: *Bifidobacteriales*, Familia: *Bifidobacteriaceae*, Género: *Bifidobacterium*, Especie: *Bifidobacterium longum*.

En una realización particular, la composición probiótica de la invención comprende *B. lactis* CECT 8145 (y/o cepas derivadas de ella), *B. longum* CECT 7347 (y/o cepas derivadas de ella) y/o *L. casei* CECT 9104 (y/o cepas derivadas de ella).

La cepa *B. lactis* CECT 8145 fue aislada a partir de heces de un niño de menos de tres (3) meses de vida, sano y alimentado con lactancia materna. Esta cepa fue depositada el 14 de mayo de 2012 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT 8145.

La cepa *L. casei* CECT 9104 fue aislada a partir de heces de un niño de menos de tres (3) meses de vida, sano y alimentado con lactancia materna. Esta cepa fue depositada el 25 de febrero de 2016 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT 9104.

La cepa *B. longum* CECT 7347 fue aislada a partir de heces de un niño sano de menos de tres (3) meses de edad sometido a lactancia materna y depositada el 20 de diciembre de 2007 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT 7347.

Dentro de la presente invención también están contemplados aquellos microorganismos o bacterias que derivan de los microorganismos *B. lactis*, *B. longum* y *L. casei* (o de sus correspondientes cepas *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 y *B. longum* CECT 7347) y que pueden formar parte de la composición probiótica de la invención, pues conservan la capacidad de remitir y/o mejorar la evolución de la DA en un individuo que padece dicha patología. Ejemplos de cepas o microorganismos derivados de las cepas comprendidas dentro de la composición probiótica de la invención pueden ser mutantes y organismos modificados genéticamente que presentan variaciones en su genoma respecto al genoma de las cepas de la invención pero que no afectan a la capacidad de las cepas de remitir y/o mejorar la evolución de la DA en un individuo. Las cepas derivadas de *B. lactis*, *B. longum* y *L. casei* (o de las cepas *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 y *B. longum* CECT 7347) pueden producirse de forma natural o de forma intencionada por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse a, el crecimiento de la cepa original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación, delección y/o inclusión de genes específicos. Así, como se indicó anteriormente, dentro de la presente invención también se contemplan organismos genéticamente modificados derivados de *B. lactis*, *B. longum* y *L. casei* (o de las cepas *B. lactis* CECT 8145, y/o *L. casei* CECT 9104 y *B. longum* CECT 7347) que conservan su capacidad de remitir y/o de mejorar la evolución de la DA en un individuo y, por lo tanto, de ser usados en el tratamiento y/o prevención de la DA. Ejemplo de un ensayo para comprobar si un organismo tiene capacidad de remitir y/o de mejorar la evolución de la DA en un individuo se describe en los ejemplos que acompañan la presente descripción.

Por otro lado, dentro de la presente invención, también se contemplan los componentes celulares, los metabolitos y las moléculas secretadas por *B. lactis*, *B. longum* y *L. casei* o sus correspondientes cepas *B. lactis* CECT 8145, y/o *L. casei* CECT 9104 y/o *B. longum* CECT 7347, así como las composiciones que comprenden dichos componentes celulares, metabolitos y moléculas secretadas y los usos de los mismos para el tratamiento y/o la prevención de la DA. Entre los componentes celulares de la bacteria se podrían incluir los componentes de la pared celular (como, por ejemplo, pero sin limitarse a, el peptidoglicano), los ácidos nucleicos, los componentes de la membrana u otros, como proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones (como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas). Los metabolitos incluyen cualquier molécula producida o modificada por la bacteria como consecuencia de su actividad metabólica, durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos o durante el almacenamiento del producto (composición probiótica de la invención). Ejemplos de estos metabolitos son, pero sin limitarse a, los ácidos orgánicos e inorgánicos, las proteínas, los péptidos, los aminoácidos, las enzimas, los lípidos, los hidratos de carbono, las lipoproteínas, los glicolípidos, las glicoproteínas, las vitaminas, las sales, los minerales y los ácidos nucleicos. Las moléculas secretadas incluyen cualquier molécula secretada o liberada al exterior por la bacteria durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, de elaboración de alimentos o fármacos) o durante el almacenamiento del producto (la composición probiótica de la invención). Ejemplos de estas moléculas son, pero sin limitarse a, los ácidos orgánicos e inorgánicos, las proteínas, los péptidos, los aminoácidos, las enzimas, los lípidos, los hidratos de carbono, las lipoproteínas, los glicolípidos, las glicoproteínas, las vitaminas, las sales, los minerales y los ácidos nucleicos.

Como entiende el experto en la materia, la composición probiótica de la invención, puede ir formulada para su administración farmacéutica, es decir, formando parte de productos farmacológicos que serán administrados al sujeto (por ejemplo, vía oral, vía tópica, etc.) y/o para su administración alimentaria, es decir, formando parte de los alimentos que son consumidos en la dieta de un sujeto. En la presente invención, dicha composición está destinada a remitir, reducir, tratar y/o prevenir la DA. Por lo tanto, en una realización particular, la composición probiótica de la invención es una composición farmacéutica y/o una composición nutricional.

La composición farmacéutica es un conjunto de componentes o compuestos que está formado, al menos, por los microorganismos *B. lactis*, *L. casei* y *B. longum*, en particular, por las cepas *B. lactis* CECT 8145, y/o *L. casei* CECT 9104 y/o *B. longum* CECT 7347 (o las cepas derivadas de ellas) en cualquier concentración y que, adicionalmente, puede comprender uno o más componentes o compuestos que posean alguna actividad biológica, farmacológica y/o veterinaria que, tras su administración a un sujeto, pueden aumentar, reforzar y/o impulsar la actividad de las cepas comprendidas en la composición probiótica de la invención. Como entiende el experto en la materia, los componentes o compuestos adicionales deben ser compatibles con las cepas de la composición probiótica de la invención. En el contexto de la presente invención, dentro del término "composición farmacéutica" también se engloban las composiciones veterinarias.

Ejemplos de componentes o compuestos útiles en el tratamiento de la DA que pueden formar parte de la composición farmacéutica incluyen, sin limitarse a, antihistamínicos H1 clásicos (e.g. hidroxicina, clemastina y dexclorfeniramina), antiestamínicos H1 de nuevo desarrollo (e.g. desfenfluramina, loratadina, cetirizina, y derivados) e inhibidores de calcineurina (e.g. tacrolimus y pimecrolimus).

Adicionalmente, en una realización particular, la composición farmacéutica comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes o compuestos de la composición probiótica de la invención, es decir, de las cepas de la invención, o que estabiliza dichos componentes o compuestos y/o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o de aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función, con carácter enunciativo pero no limitativo, de mantener los componentes unidos (por ejemplo, almidones, azúcares o celulosas), de endulzar, de aportar un colorante, de proteger el principio activo (por ejemplo, para aislarlo del aire y/o la humedad), de rellenar una pastilla, una cápsula o cualquier otra forma de presentación o de desintegrar para facilitar la disolución de los componentes, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término "excipiente" se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas y/o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente "farmacéuticamente aceptable" debe permitir la actividad de los componentes o compuestos de la composición farmacéutica, es decir, debe ser compatible con las cepas de la invención.

La "forma galénica" o "forma farmacéutica" es la disposición a la que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir una composición farmacéutica o un fármaco. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

El "vehículo" o "portador" es, preferiblemente, una sustancia inerte. Las funciones del vehículo son facilitar la incorporación de otros componentes o compuestos, permitir una mejor dosificación y/o administración y/o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el fármaco para diluir cualquiera de los componentes o compuestos de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que, aun sin diluir dichos componentes o compuestos, es capaz de permitir una mejor dosificación y/o administración y/o dar consistencia y forma al fármaco. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente. El vehículo puede ser natural o no natural. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitarse a, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, almidón, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumante, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroetales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo estén permitidos y evaluados para que no causen daño al sujeto al que se les administra. Adicionalmente, el excipiente y/o el vehículo pueden ser naturales, es decir, existen en la naturaleza, o no naturales, es decir, pueden darse o no en la naturaleza pero, si están en la naturaleza, no se encuentran de forma natural en combinación con las cepas de la invención.

En cada caso la forma de presentación de la composición farmacéutica se adaptará al tipo de administración utilizada. Por ello, la composición se puede presentar bajo la forma de soluciones o bajo cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición farmacéutica se puede formular en formas sólidas, semisólidas o líquidas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones, supositorios, geles o microesferas. En una realización particular, la composición farmacéutica está formulada para su administración en forma líquida o en forma sólida.

En otra realización particular, la formulación sólida se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, comprimidos para chupar, caramelos, comprimidos masticables, chicles, cápsulas, sobres, polvo, granulados,

partículas recubiertas o comprimidos recubiertos, tableta, pastillas, trocisco, comprimidos y cápsulas gastroresistentes y tiras y/o películas dispersables.

5 En otra realización particular, la formulación líquida se selecciona del grupo que consiste en soluciones orales, suspensiones, emulsiones y jarabes.

Asimismo, se conocen diversos sistemas que pueden usarse para administrar de forma sostenida la composición probiótica de la invención, incluyendo, por ejemplo, la encapsulación en liposomas, las microburbujas, las micropartículas o las microcápsulas y similares de los mismos. Las formas de liberación sostenida adecuadas así como los materiales y métodos para su preparación son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Así, la forma administrable por vía oral de la composición probiótica de la invención está en una forma de liberación sostenida que comprende adicionalmente, al menos, un recubrimiento o matriz. El recubrimiento o matriz de liberación sostenida incluye, pero sin limitación a, polímeros naturales, semisintéticos o sintéticos, insolubles en agua o modificados, ceras, grasas, alcoholes grasos, ácidos grasos, plastificantes naturales semisintéticos o sintéticos, o una combinación de dos o más de todos los anteriores. Los recubrimientos entéricos pueden aplicarse usando procesos convencionales conocidos por los especialistas en la técnica.

Adicionalmente a lo descrito en párrafos anteriores, en la presente invención también se contempla la posibilidad de que la composición probiótica de la invención se pueda administrar a un sujeto de forma conjunta con otros componentes o compuestos aunque éstos no formen parte de la composición probiótica. Ejemplos de dichos componentes o compuestos han sido mencionados en párrafos anteriores.

En el caso de que la composición probiótica de la invención esté formulada como una composición nutricional, dicha composición nutricional puede ser un alimento o ir incorporada en un alimento o producto alimenticio, destinado tanto a la alimentación humana como a la alimentación animal. Así, en una realización particular, la composición nutricional es seleccionada de entre un alimento (que puede ser un alimento para fines nutricionales específicos o un alimento medicinal) y un suplemento nutricional.

En la presente invención el término "composición nutritiva" o "composición nutricional" se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar a dicho sujeto. En la presente invención, dicha composición nutricional está destinada a remitir, reducir, tratar y/o prevenir la DA.

El término "suplemento", sinónimo de cualquiera de los términos "suplemento dietético", "suplemento nutricional", "suplemento alimentario", "suplemento alimenticio" o "complemento alimenticio" hace referencia a aquellos productos o preparados cuyo fin es complementar la dieta normal, consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico sobre el individuo. En la presente invención, la "sustancia" que tiene un efecto nutricional o fisiológico sobre el individuo cuando el complemento alimenticio ingerido son los microorganismos *B. lactis*, *L. casei* y *B. longum*, en particular, las cepas *B. lactis* CECT 8145, y/o *L. casei* CECT 9104 y/o *B. longum* CECT 7347, que forman parte de la composición probiótica de la invención. El complemento alimenticio puede encontrarse en forma simple o combinada y ser comercializado en forma dosificada, es decir, en cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares, bolsitas de polvos, ampollas de líquido y botellas con cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en cantidad unitaria.

Existen una amplia gama de nutrientes y otros elementos que puede estar presentes en los complementos alimenticios incluyendo, sin limitar a, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, fibra, enzimas, plantas y extractos vegetales. Puesto que su función es complementar el aporte de nutrientes de una dieta, no deben utilizarse como sustituto de una dieta equilibrada, ni su ingesta debe superar la dosis diaria expresamente recomendada por el médico o nutricionista. La composición probiótica también puede formar parte de los denominados "alimentos para grupos especiales", es decir, alimentos que satisfacen necesidades nutricionales particulares.

Ejemplos de alimentos que pueden comprender la composición probiótica de la invención (los microorganismos *B. lactis*, *L. casei* y *B. longum*, en particular, las cepas *B. lactis* CECT 8145, y/o *L. casei* CECT 9104 y/o *B. longum* CECT 7347 (o las cepas derivadas de ellas)) incluyen, pero sin limitarse a, piensos, productos lácteos, productos vegetales, productos cárnicos, aperitivos, chocolates, bebidas, alimentos infantiles, cereales, fritos, bollería industrial y galletas. Ejemplos de productos lácteos incluyen, pero sin limitarse a, productos derivados de la leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitarse a, yogur o queso) o no fermentada (por ejemplo, pero sin limitarse a, helado, mantequilla, margarina o suero lácteo). El producto vegetal es, por ejemplo, pero sin limitarse a, un cereal en cualquier forma de presentación, fermentado (por ejemplo, pero sin limitarse a, yogur de soja o yogur de avena) o no fermentado, y un aperitivo. La bebida puede ser, pero sin limitarse a, leche no fermentada. En una realización particular, el producto alimentario o alimento se selecciona del grupo que consiste en zumos de frutas o vegetales, helados, formulaciones infantiles, leche, yogur, queso, leche fermentada, leche en polvo, cereales, productos de repostería, productos en base de leche, producto cárnico y bebidas.

Adicionalmente, la composición probiótica de la invención puede comprender otros microorganismos adicionales a *B. lactis*, *L. casei* y *B. longum*, en particular, a las cepas *B. lactis* CECT 8145, y/o *L. casei* CECT 9104 y/o *B. longum* CECT 7347. Así, en una realización particular, la composición probiótica de la invención comprende, además, un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. y combinaciones de los mismos.

En otra realización todavía más particular, *Lactobacillus* sp. es *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. paraplantarum* o *L. reuteri*; *Streptococcus* sp. es *St. thermophilus*; *Bifidobacterium* sp. es *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis* o *B. pseudocatenulatum*; *Saccharomyces* es *S. cerevisiae* o *S. boulardii*; o *Kluyveromyces* sp. es *K. lactis* o *K. marxianus*.

En otra realización particular, la composición probiótica de la invención es administrada a un sujeto a través de la dieta.

Como entiende el experto en la materia, los microorganismos *B. lactis*, *L. casei* y *B. longum*, en particular, las cepas *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 y/o *B. longum* CECT 7347, tienen que estar presentes en la composición probiótica de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz para que puedan ejercer su efecto de remitir, reducir, tratar y/o prevenir la DA.

En la presente invención se entiende por "cantidad terapéuticamente eficaz" aquella cantidad del componente o compuesto de la composición farmacéutica que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para producirle el efecto deseado. Dicho componente o compuesto de la composición farmacéutica se refiere a los microorganismos *B. lactis*, *L. casei* y *B. longum*, en particular, a las cepas *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 y/o *B. longum* CECT 7347. Como sabe el experto en la materia, la cantidad terapéuticamente efectiva puede variar en función de, por ejemplo, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del sujeto, al igual que en función del modo y del tiempo de administración, de la velocidad de excreción o de la combinación de fármacos, entre otros factores. Así, en una realización particular, la concentración total de microorganismos de *B. lactis*, *L. casei* y *B. longum*, en particular, de las cepas *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 y/o *B. longum* CECT 7347, en la composición es de entre 10^3 y 10^{12} ufc, preferiblemente, 10^9 ufc. En otra realización particular, la dosis de administración de microorganismos de *B. lactis*, *L. casei* y *B. longum*, en particular, *B. lactis* CECT 8145, y/o *L. casei* CECT 9104 y/o *B. longum* CECT 7347, en la composición es de entre 10^6 y 10^{12} ufc/día, preferiblemente, 10^9 ufc/día, y en otra realización todavía más particular, el régimen de administración es de, al menos, una vez al día, en particular, dos veces al día, y más en particular, tres veces al día, una con cada ingesta de comida (desayuno, almuerzo y cena).

En otra realización particular, la concentración de *B. longum*, en particular de la cepa *B. longum* CECT 7347, con respecto a la concentración total de microorganismos presentes en la composición, se selecciona de entre cualquiera de los siguientes valores: 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80%. En otra realización particular, la concentración de *B. lactis*, en particular de la cepa *B. lactis* CECT 8145, con respecto a la concentración total de microorganismos presentes en la composición, se selecciona de entre cualquiera de los siguientes valores: 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80%. En otra realización particular, la concentración de *L. casei*, en particular de la cepa *L. casei* CECT 9104, con respecto a la concentración total de microorganismos presentes en la composición, se selecciona de entre cualquiera de los siguientes valores: 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80%. Tal y como entiende el experto en la materia, la composición de la invención comprende cualquier combinación de las concentraciones descritas para cada uno de los microorganismos descritas anteriormente.

En otra realización particular, la concentración de *B. longum* con respecto a la concentración total de microorganismos presentes en la composición es de, al menos, entre el 25% y el 45%, preferiblemente, al menos, el 35%; la concentración de *B. lactis* con respecto a la concentración total de microorganismos es de al menos, entre el 25% y el 45%, preferiblemente, al menos, el 35%; y/o la concentración de *L. casei* con respecto a la concentración total de microorganismos es entre el 20% y el 40%, preferiblemente del 30%.

La composición probiótica de la invención es útil en el tratamiento y/o prevención de la DA en un individuo, así como en la mejora de la evolución de la DA una vez suspendida la ingesta de la composición probiótica aquí descrita.

Así, otro objeto descrito en la presente invención se refiere a la composición probiótica descrita en la presente invención para usarla como medicamento.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es la DA.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a la composición probiótica tal y como se describe anteriormente, en el tratamiento y/o la prevención de la DA en un individuo que padece dicha patología.

En la presente invención el término "sujeto" es equivalente al término "individuo"; por lo que ambos términos pueden emplearse indistintamente en la presente invención. Se entiende por "sujeto", además de cualquier individuo, cualquier animal perteneciente a cualquier especie. Ejemplos de sujetos incluyen, sin limitarse a, animales de interés comercial tales como aves (gallinas, avestruces, pollos, ocas, perdices, etc.); conejos; liebres; animales domésticos (perros, gatos, etc.); ganado ovino; ganado caprino (cabras, etc.); ganado porcino (jabalíes, cerdos, etc.); ganado equino (caballos, ponis, etc.); ganado vacuno o bovino (toros, vacas, bueyes, etc.); animales de interés cinético, tales como ciervos, venados, renos, etc.; y los seres humanos. No obstante, en una realización particular, el sujeto es un mamífero, preferiblemente, el mamífero es un ser humano de cualquier raza, sexo o edad.

En la presente invención se entiende por "prevención" evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un individuo, en particular, cuando dicho individuo tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la padezca. En la presente invención, la enfermedad o condición patológica es la DA.

En la presente invención, el término "tratar" o "tratamiento" comprende inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo; aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica; y/o estabilizar la enfermedad o la condición patológica en un individuo. En la presente invención, la enfermedad o condición patológica es la DA.

En la presente invención se entiende por "dermatitis atópica" (DA) a una dermatosis inflamatoria, prurítica, de curso crónico, caracterizada por el desarrollo de lesiones de eczema con un patrón de distribución característico que afecta a individuos que presentan una hiperreactividad cutánea frente a diversos factores ambientales que son inocuos para los individuos no atópicos. Al tratarse de un curso crónico existen brotes de carácter inflamatorio por esta gran hiperreactividad cutánea ocasionando lesiones tanto en zonas de pliegues cutáneos como en zonas de extensión, manteniendo el patrón de eccema agudo o subagudo. La DA puede manifestarse en muchas formas y lugares distintos de la piel.

Método de tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias de la piel

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de la DA en un individuo, de aquí en adelante, método de tratamiento de la invención, que comprende la administración de la composición probiótica descrita en la presente invención, a un individuo que presenta DA.

Todos los términos, definiciones y realizaciones particulares de anteriores aspectos inventivos son aplicables al método de tratamiento de la invención.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán, en parte, de la descripción y, en parte, de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un diagrama que muestra el análisis de los componentes principales de los perfiles microbiológicos de muestras de heces de pacientes con dermatitis (símbolo cuadrangular y en negro) comparado con individuos sanos que pertenecen al enterotipo 1 (símbolo circular y en gris oscuro), al enterotipo 2 (símbolo triangular y en gris) y al enterotipo 3 (símbolo romboidal y en gris claro).

La Figura 2 es un diagrama que muestra el análisis de variabilidad de las muestras de heces de pacientes con dermatitis comparado con población sana en cada uno de los enterotipos. Las significatividades estadísticas después de aplicar un Wilcoxon test están indicadas en la figura.

La Figura 3 es un diagrama que muestra el análisis de componentes principales de pacientes con dermatitis pertenecientes o catalogados como enterotipo 1 (símbolo cuadrado y en negro) comparado con muestras de población sana del enterotipo 1 (símbolo circular y en gris). Los géneros más representados en las muestras localizadas en la parte derecha y superior de la figura se muestran en negro y los que están menos representados en esta misma situación se muestran en gris. Con respecto a las muestras localizadas en el extremo inferior izquierdo, el comportamiento es el contrario: son menos abundantes los que están marcados en negro y más abundantes los que están marcados en gris.

La Figura 4 es un diagrama que muestra el análisis de componentes principales de pacientes con dermatitis pertenecientes o catalogados como enterotipo 2 (símbolo cuadrangular y en negro), comparado con muestras de población sana del enterotipo 2 (símbolo circular y en gris). Los géneros más representados en las muestras localizadas en la parte derecha y superior de la figura se muestran en negro y los que están menos representados en esta misma situación se muestran en gris. Con respecto a las muestras localizadas en el extremo inferior izquierdo, el comportamiento es el contrario: son menos abundantes los que están marcados en negro y más abundantes los que están marcados en gris.

La Figura 5 es un diagrama que muestra el análisis de componentes principales de pacientes con dermatitis pertenecientes o catalogados como enterotipo 3 (símbolo cuadrangular y en negro), comparado con muestras de población sana del enterotipo 3 (símbolo circular y en gris). Los géneros más representados en las muestras localizadas en la parte derecha y superior de la figura se muestran en negro y los que están menos representados en esta misma situación se muestran en gris. Con respecto a las muestras localizadas en el extremo inferior izquierdo, el comportamiento es el contrario: son menos abundantes los que están marcados en negro y más abundantes los que están marcados en gris.

La Figura 6 muestra los resultados del índice SCORAD al mes de iniciado el tratamiento con la composición probiótica de la invención o con el placebo. Los resultados muestran el valor absoluto del SCORAD en cada grupo de tratamiento (Figura 6A) y el % de reducción del SCORAD en ese tiempo de tratamiento en los dos grupos (Figura 6B). V3, visita mes 1. Grupo A, grupo que consumió el placebo; Grupo B, grupo que consumió la composición probiótica.

La Figura 7 muestra los resultados del índice SCORAD a los dos meses de iniciado el tratamiento con la composición probiótica de la invención o con el placebo. Los resultados muestran el valor absoluto del SCORAD en cada grupo de tratamiento (Figura 7A) y el % de reducción del SCORAD en ese tiempo de tratamiento en los dos grupos (Figura 7B). V5, visita mes 2. Grupo A, grupo que consumió el placebo; Grupo B, grupo que consumió la composición probiótica.

La Figura 8 muestra los resultados del índice SCORAD a los tres meses (fin del estudio) de iniciado el tratamiento con la composición probiótica de la invención o con el placebo. Los resultados muestran el valor absoluto del SCORAD en cada grupo de tratamiento (Figura 8A) y el % de reducción del SCORAD en ese tiempo de tratamiento en los dos grupos (Figura 8B). V7, visita mes 3. Grupo A, grupo que consumió el placebo; Grupo B, grupo que consumió la composición probiótica.

La Figura 9 muestra el % de mejoría durante el tiempo del estudio en el índice SCORAD medido en al mes, dos meses y tres meses (fin de estudio) tras inicio del tratamiento. Las diferencias entre los dos grupos de tratamiento son estadísticamente significativas a partir del mes uno y estas diferencias se incrementen en los meses 2 y tres del estudio. Línea discontinua, grupo que consumió la composición probiótica; Línea continua, grupo que consumió el placebo.

La Figura 10 muestra la evolución en el tiempo del índice SCORAD medido en al mes, dos meses y tres meses (fin de estudio) tras inicio del tratamiento. Las diferencias entre los dos grupos de tratamiento son estadísticamente significativas. Línea discontinua, grupo que consumió la composición probiótica; Línea continua, grupo que consumió el placebo.

La Figura 11 muestra la evolución en el número de pacientes que padecen un nuevo brote de DA (Figura 11A), el número total de pacientes que presentan nuevos brotes de DA (Figura 11B), y el porcentaje de pacientes libre de nuevos brotes (Figura 11C); durante los tres meses de seguimiento, tras suspender el tratamiento de intervención con placebo o con la composición probiótica de la invención. Las diferencias entre los dos grupos de intervención son estadísticamente significativas en los tres meses de evaluación tras el inicio del seguimiento para las tres variables analizadas. Línea negra: pacientes que han recibido el placebo; línea gris, pacientes que han recibido la composición probiótica.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto las propiedades de la composición probiótica de la invención.

EJEMPLO 1: Determinación de la microbiota bacteriana en pacientes con DA

I. MATERIAL Y MÉTODOS

Partiendo de las muestras de heces de 49 pacientes con dermatitis, se realizó una extracción del material genético (ADN) mediante una combinación de rotura mecánica y enzimática de paredes y membranas celulares, para poder

incrementar el rendimiento de la extracción y no sesgar la presencia de bacterias con pared celular (Gram +). Este material genético obtenido en la extracción, es medido por calidad y cantidad usando un Nanodrop 2000 de ThermoScientific para inspeccionar los ratios 260/280 y 260/230 que nos marquen la calidad de la extracción (presencia de inhibidores de PCR, pigmentos, etc.). Posteriormente y una vez comprobada la calidad de las mismas, se procede a la realización de librerías de secuenciación masiva capturando la región hipervariable V3-V4 del gen 16s rRNA bacteriano (basado en Klindworth A, et al. (2013) Nucleic Acids Res 41: e1) según el protocolo descrito por Illumina para el análisis de la composición microbiana basada en la captura del 16s rRNA. Cada librería fue cuantificada con Quant-iT PicoGreen de Invitrogen y se mezclaron de manera equimolar para su posterior secuenciación.

Las muestras fueron secuenciadas en la plataforma MiSeq en combinación de 300 ciclos "Paired-End". Los ficheros fastq resultantes fueron tratados para asegurar el análisis de secuencias de alta calidad. Para ello se realizó un control de calidad que consistió en:

1. Unión de los extremos para reconstruir secuencias únicas usando el programa 'pear' v0.9.6. (Zhang J, et al. (2014) Bioinformatics 30(5):614-20).
2. Eliminación de adaptadores de secuenciación y cebadores de captura de las regiones hipervariable V3 y V4 con el programa cutadapt versión 1.9.1. (Martin M (2010), EMBnet.journal, [S.I.], 17(1): 10-12. ISSN 2226-6089)
3. Eliminación de secuencias de baja calidad usando las FASTx-ToolKit versión 0.91.
4. Eliminación de quimeras producto de la PCR mediante el programa UCHIME (Dec 2015) (Edgar RC, et al. (2011) Aug 15;27(16):2194-200) y la última base de datos de quimeras.

Las muestras resultantes fueron comparadas contra una base de datos de secuencias del 16S rRNA (del NCBI) usando un alineamiento local tipo BLAST (Altschul SF, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410).

Cada una de las secuencias en las que se obtuvo una anotación al noventa y cinco por ciento (95%) de identidad, fueron inspeccionadas a distintos niveles taxonómicos de Phylum, Familia, Género y Especie.

Se utilizó el paquete estadístico R para la construcción de estadísticas y gráficas de análisis de componentes principales (PCA).

Es interesante mencionar que aunque existe una gran variación en las poblaciones microbianas del tracto digestivo de cada individuo, los estudios epidemiológicos sugieren que la microbiota de casi todos ellos se puede clasificar como perteneciente a tres categorías distintas conocidas con el nombre de enterotipos (Arumugam et al., (2011) Nature 473:174-180). Esta clasificación se basa en la predominancia en cada uno de estos tres enterotipos de miembros de los géneros *Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococcus*. Se habla de enterotipo 1 (ent1) cuando predomina el género *Bacteroides*, enterotipo 2 (ent2) si predomina el género *Prevotella* y enterotipo 3 (ent3) cuando predomina el género *Ruminococcus* (Dave et al., (2012). Trans. Res. 160, 246-257).

II. RESULTADOS

Como se ha mencionado anteriormente, se analizó la composición microbiana en muestras de heces de individuos enfermos afectados por DA respecto a muestras de heces de individuos sanos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que tal y como se puede apreciar en la Figura 1, los perfiles microbiológicos de las muestras de pacientes con DA están más cercanos a individuos sanos con enterotipo 3 que al resto de individuos sanos. En dicha Figura 1 se observa en la parte superior izquierda que los pacientes con DA (símbolo cuadrado y en negro) se localizan junto con los individuos sanos con enterotipo 3 (símbolo rombo y en gris claro), aunque con más dispersión en el caso de los pacientes con DA que en el de los individuos sanos de enterotipo 3. Por el contrario, los individuos de la población sana con enterotipo 1 (símbolo circular y en gris oscuro) o enterotipo 2 (símbolo triangular y en gris) se distribuyen en la parte superior, de izquierda a derecha, y en la parte izquierda, de arriba abajo, respectivamente. También se observa que las muestras que se distribuyen más hacia la derecha de la gráfica tienen mayor presencia del género *Bacteroides* y una disminución de los géneros *Prevotella* y *Faecalibacterium*, mientras que las que las muestras que se distribuyen en la parte superior de la gráfica de la Figura 1 presentan una clara ausencia de *Prevotella*; de ahí que las muestras de pacientes sanos con enterotipo 2 (mayor presencia de especies del género *Prevotella*), se localicen en la parte inferior izquierda y muestren un aumento en *Faecalibacterium* y *Ruminococcus*. Estos datos nos permiten afirmar que los pacientes con DA tienen un microbioma cercano a los individuos sanos con enterotipo 3, pero con una variabilidad y composición microbiana diferente.

Esta diferente variabilidad y composición microbiana entre individuos sanos con enterotipo 3 y pacientes con DA se aprecia con más detalle cuando se analiza la variabilidad de poblaciones bacterianas en las muestras de la población sana (con cada uno de sus tres distintos enterotipos) respecto a las muestras de pacientes con DA mediante el índice de Shannon (Figura 2). Tal y como se muestra en dicha Figura 2, en general, los pacientes con

DA poseen mayor variabilidad con respecto a los sanos, siendo la mediana y el rango inter-cuartílico de 2,97 (2,84-3,06) para pacientes con DA y de 1,99 (1,37-2,52), 2,14 (1,50-2,62) y 2,23 (1,91-2,57) para los individuos sanos con enterotipos 1, 2 y 3, respectivamente. Específicamente, los pacientes con DA poseen una variabilidad bacteriana significativamente superior que la que presentan cualquiera de los enterotipos de individuos sanos, ya que en todos los casos el p-valor es <0.0001 cuando se compara la variabilidad microbiana que presentan los pacientes con DA frente a la variabilidad de la población sana con distintos enterotipos.

Para determinar las bacterias que diferencian a la población sana frente a la población con DA se procedió a clasificar a los pacientes con DA en función de la predominancia de bacterias del género *Bacteroides* (ent1), *Prevotella* (ent2) o *Ruminococcus* (ent3) y posteriormente se analizó si existían diferencias entre cada uno de los diferentes enterotipos de la población sana respecto a los diferentes enterotipos en la población con DA. En primer lugar, del total de 49 pacientes con DA, 25 se clasificaron como ent1, 2 como ent2 y 22 como ent3. De la misma manera, del total de 324 individuos sanos, 298 se clasificaron como ent1, 21 como ent2 y 5 como ent3. A continuación se analizó la variabilidad bacteriana en cada uno de los enterotipos, 1, 2 o 3 entre pacientes con DA frente a sujetos sanos.

En la Figura 3 se muestra la variabilidad bacteriana entre sujetos sanos frente a pacientes con DA, todos ellos con enterotipo 1. Como se muestra en dicha Figura 3, los individuos sanos tienen mayor cantidad de *Bacteroides* que los pacientes con DA, mientras que los pacientes con DA poseen niveles mayores de los géneros *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y, sobre todo, baja presencia de especies del género *Alistipes*.

En la Figura 4 se muestra la variabilidad bacteriana entre sujetos sanos frente a pacientes con DA, todos ellos con enterotipo 2. En este caso, no es posible diferenciar, en cuanto a géneros bacterianos, entre los pacientes con DA con enterotipo 2 de los individuos sanos con el mismo enterotipo. Pero por otro lado, dicha figura si pone de manifiesto el bajo nivel de pacientes con DA que están clasificados como enterotipo 2.

Al igual que ocurre con los individuos sanos y con DA con enterotipo 1, en el caso de los pacientes con DA clasificados como enterotipo 3 (Figura 5), sí que se aprecian diferencias entre pacientes con DA respecto a individuos sanos. Como se observa en dicha Figura 5, los pacientes con DA poseen menor número de especies del género *Ruminococcus* que los pacientes sanos, además de una menor cantidad de especies del género *Faecalibacterium*.

Teniendo en cuenta todos los resultados mostrados anteriormente, queda claro que la microbiota de los pacientes con DA respecto a la microbiota de la población sana es diferente en cuanto a composición y variabilidad. Además, ha quedado demostrado que existe una menor cantidad de pacientes con DA que pertenezcan al enterotipo 2, y por otro lado, los pacientes con DA también se demuestra que los pacientes con DA muestran una mayor variabilidad microbiana, aunque con un menor número de bacterias de las especies de los géneros importantes en cada enterotipo, específicamente los géneros *Bacteroides* y *Ruminococcus* para los enterotipos 1 y 3, respectivamente.

EJEMPLO 2: Análisis de la eficacia del uso de la composición probiótica de la invención en la prevención y/o tratamiento de la DA.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la eficacia de la composición probiótica de la presente invención en la reducción de la sintomatología y del empleo de corticosteroides tópicos en el tratamiento de la DA se llevó a cabo un ensayo clínico piloto aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, en un grupo de 20 pacientes que padecían DA con edades comprendidas entre los 4 a 17 años.

Por lo tanto, los pacientes incluidos en el ensayo están diagnosticados con DA según los criterios de Hanifin y Rajka (Hanifin JM, *et al.* Acta Derm Venereol 1980;92:44-7), cumplen todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión indicados en el ensayo, y además, utilizan o pueden utilizar corticosteroides tópicos para el tratamiento de los brotes de DA, junto con otro tipo de principios activos que utilicen como tratamiento habitual, tales como emolientes, corticoides sistémicos, antihistamínicos, etc.

La asignación de cada paciente al grupo de tratamiento o al grupo placebo se realiza mediante una aleatorización 1:1 estratificada por bloques teniendo en cuenta las variables: sexo, edad, antecedentes familiares de primer grado de consanguinidad de atopia o DA e inicio de la DA antes de los cuatro años de edad.

La composición probiótica de la invención comprende *Bifidobacterium lactis* CECT 8145, *Bifidobacterium longum* CECT 7347 y *Lactobacillus casei* CECT 9104, formulada en una base de maltrotexina de tapioca y azúcar, conteniendo 5×10^{10} ufc/gramo.

El placebo se administra con la misma presentación que la composición de la invención, pero conteniendo exclusivamente maltodextrina de tapioca y azúcar.

La pauta de dosificación de la composición probiótica de la invención o del placebo es una cápsula al día.

Para el tratamiento de los brotes de DA que puedan tener los pacientes incluidos en el ensayo se utiliza como corticosteroide tópico metilprednisolona aceponato, y la duración de dicho tratamiento no será mayor a dos semanas. Si se precisase del tratamiento con corticosteroides sistémicos se prescribirá Deflazacort. Para el tratamiento del picor se utilizará Desloratadina y para casos de DA infectada se utilizará como antibiótico uno de uso general tal como el ácido fusídico.

El período de tratamiento es de doce semanas, desde el reclutamiento de los pacientes hasta la última exploración. Una vez realizada la visita de inclusión en el estudio (basal) y asignado el tratamiento (grupo de tratamiento o placebo), se programan siete visitas, que tienen lugar en las semanas 4, 8 y 12 desde el inicio del tratamiento con la composición de la invención o con el placebo, donde se evalúa el índice de SCORAD; y en las semanas 2, 6 y 10 donde se revisa el cuaderno de recogida de datos (CRD) del paciente.

Todas las medicaciones que el paciente tomará durante el estudio, especificando las dosis, vía de administración y duración del tratamiento (fecha de inicio-fecha de finalización), se anotarán en la historia clínica del paciente y en el CRD, incluyendo la medicación del estudio. Adicionalmente, en cada visita se anota en el CRD también el recuento de las cápsulas devueltas. En la Tabla 1 se muestran las características basales demográficas y clínicas de los pacientes en cada uno de los grupos de tratamiento. Y en la Tabla 2 el desarrollo y etapas del ensayo.

Tabla 1. Características basales demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en cada uno de los grupos de tratamiento.

	Tratamiento	Media	DE	MES
Edad	Placebo	8,96	3,940	0,804
	Composición	9,35	3,577	0,702
Scorad	Placebo	31,6417	5,05129	1,03109
	Composición	33,3077	3,51351	,68906
IgE_Inicial	Placebo	292,08	636,537	129,933
	Composición	428,44	723,861	144,772
Eosin_Inicial	Placebo	4,73	4,274	0,872
	Composición	4,96	5,799	1,160
V2 Total Corticoides*	Placebo	3,68	4,224	0,901
	Composición	3,00	3,240	0,648
V2 Total Antihistamínicos*	Placebo	0,32	0,780	0,166
	Composición	1,28	2,072	0,414

*: Días de tratamiento en 2 semanas; DE: desviación estándar; MES: media del error estándar.

Tabla 2. Protocolo del ensayo clínico.

Visitas	0 / 1	2	3	4	5	6	7
Semana	0	2	4	6	8	10	12
Criterios de inclusión/exclusión	X						
Firma del consentimiento informado	X						
Historia clínica	X						
Exploración física	X		X		X		X
Determinaciones de embarazo	X						X
Exploraciones complementarias	X			X			

SCORAD	X		X		X		X
Tratamiento farmacológico (composición probiótica o placebo)	X		X		X		
Recogida de datos del cuaderno diario		X		X		X	X
Entrega de la medicación	X		X		X		
Devolución y recuento medicación no consumida			X		X		X
Evaluación de acontecimientos adversos		X	X	X	X	X	X

Todos los análisis estadísticos llevados a cabo para la obtención de los resultados finales mostrados a continuación se llevaron a cabo utilizando el software SPSS 20.0.

5 Adicionalmente, el estudio se desarrolla de acuerdo con la Declaración de Helsinki, modificada en las sucesivas asambleas mundiales. Todos los participantes contaban con historia clínica y carta de consentimiento informado (por el propio paciente o por su tutor o representante legal) conforme a la Declaración de Helsinki y aprobada por un comité de ética e investigación institucional.

10 II. RESULTADOS

En primer lugar se analizó si las muestras incluidas en cada grupo de estudio, grupo placebo y grupo con la composición probiótica de la invención, eran homogéneos, demostrándose tal y como se muestra en la Tabla 3 que cumplían dicho requisito ya que no se mostraron diferencias entre ninguna de las variables analizadas para cada grupo de estudio.

Tabla 3. Homogenidad de las dos muestras. Estadísticos de prueba^a

	Edad	Scorad	V2 Total Corticosteroides*	V2 Total Antihistamínicos*
U de Mann-Whitney	286,500	260,500	271,000	223,500
W de Wilcoxon	586,500	560,500	596,000	476,500
Z	-0,497	-1,000	-0,088	-1,435
Sig. Asintótica (bilateral)	0,619	0,317	0,930	0,151

^a: Variable de agrupación: no se dan diferencias en variables principales al inicio del estudio; *: días de tratamiento en 2 semanas.

Como se ha mencionado anteriormente se calculan los valores medios (media y mediana) ± desviación estándar (DE) para los datos globales al inicio del estudio, al mes, a los dos y tres meses de tratamiento. En cada uno de estos puntos se comparan los valores con los que presentaba el paciente al comienzo del estudio, mediante el test de Wilcoxon.

Eficacia de la composición de la invención al mes de iniciar el tratamiento.

Transcurrido un mes de tratamiento se analizó el índice SCORAD comparándolo tanto entre grupos, como respecto al valor inicial al comienzo del tratamiento. En la Tabla 4 se muestran los cambios en valor de número absoluto y en forma de porcentaje.

Tabla 4. Índice SCORAD transcurrido un mes del comienzo del tratamiento con la composición probiótica de la invención o con el placebo.

Tratamiento		SCORAD mes 1	% cambio SCORAD mes 1
Placebo	Media	25,8500	16,0015
	DE	8,02355	23,17611
	Mediana	24,8500	18,0150
Composición	Media	19,6182	41,7586
	DE	7,33580	19,27088
	Mediana	19,5000	40,8150
U de Mann-Whitney		124,500	79,000
W de Wilcoxon		377,500	289,000
Z		-2,406	-3,551
Sig. asintótica (bilateral)		0,016	0,000

Tal y como muestran los resultados de la Tabla 4 y Figura 6, tras un mes de tratamiento ya se observan diferencias significativas en el índice SCORAD entre el grupo placebo respecto al grupo tratado con la composición probiótica de la invención. En las Figuras 7 y 8 se muestra los cambios en el índice SCORAD en las visitas realizadas a los 2 (Figura 7) y tres meses (Figura 8) de tratamiento respecto al estado basal entre el grupo tratado con la composición probiótica de la invención y el grupo placebo.

En la Figura 9 se muestra que el grupo tratado con la composición de la invención muestra un menor índice SCORAD medido al mes, dos meses y tres meses de comenzar el tratamiento respecto al grupo placebo. Como se observa en dicha Figura 9 las diferencias entre los dos grupos de tratamiento son estadísticamente significativas ya a partir del primer mes de tratamiento, incrementándose dichas diferencias a los 2 (v5) y 3 (V7) meses de comenzar el estudio.

En la Figura 10 se muestra la evolución en el tiempo del índice SCORAD medido al uno (V3), dos (V5) y tres (V7) meses tras el inicio del estudio. Las diferencias entre el grupo tratado con la composición de la invención respecto al grupo placebo son estadísticamente significativas, poniéndose de manifiesto las ventajas del uso de la composición en el tratamiento de pacientes con DA.

Respecto al uso de los corticosteroides tópicos en cada grupo de estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de tratamiento en la variable días de uso de corticoides tópicos al mes de tratamiento (Tabla 5), comparando ambos grupos de tratamiento mediante el test de Wilcoxon con un nivel de significación estadística del cinco por ciento (5%). Por el contrario, sí se observa una tendencia a no usar corticoides tópicos que es mayor en el grupo tratado con la composición probiótica de la invención respecto al grupo placebo, específicamente en los meses 2 y 3 del estudio. Cabe destacar que no se llegó a alcanzar la significación estadística debido principalmente al tamaño muestral del estudio.

Tabla 5. Análisis de los corticosteroides tópicos utilizados en cada grupo de tratamiento transcurrido un mes del comienzo del ensayo. La variable de agrupación utilizada para la obtención de los datos mostrados es el tipo de tratamiento, composición probiótica de la invención o placebo.

Estadísticos utilizados	V3 Total días corticoides
U de Mann-Whitney	210,500
W de Wilcoxon	441,500
Z	-0,512
Sig. asintótica (bilateral)	0,108

Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de tratamiento, composición probiótica de la invención vs placebo, cuando se analiza la variable de días de uso de antihistamínicos en el primer mes de tratamiento (Tabla 6). Dicha variable se analiza utilizando el test de Wilcoxon con un nivel de significación estadística del cinco por ciento (5%) en cada grupo de tratamiento.

Tabla 6. Análisis de los antihistamínicos utilizados en cada grupo de tratamiento transcurrido un mes del comienzo del ensayo. La variable de agrupación utilizada para la obtención de los datos mostrados es el tipo de tratamiento: composición probiótica de la invención vs placebo.

Estadísticos utilizados	V3 Total días antihistamínicos
U de Mann-Whitney	220,500
W de Wilcoxon	473,500
Z	-0,578

Estadísticos utilizados	V3 Total días antihistamínicos
Sig. asintótica (bilateral)	0,563

5 A continuación se muestra en la Tabla 7 un resumen de los datos de la eficacia del uso de la composición probiótica de la invención en el tratamiento de la DA tras un mes de administración de la misma, específicamente en lo que se refiere a las variables analizadas: índice Scorad, uso de corticoides tópicos y uso de antihistamínicos, respecto al grupo de pacientes tratados con placebo.

Tabla 7. Índice Scorad, total de días de uso de corticoides y total de días de uso de antihistamínicos del grupo tratado con la composición probiótica de la invención respecto al grupo tratado con placebo.

	Tratamiento	Rango promedio	Suma de rangos	Significación estadística
Scorad 1 mes	Placebo	26,28	525,50	0,016
	Composición	17,16	377,50	
% mejoría Scorad 1 mes	Placebo	14,45	289,00	0,000
	Composición	27,91	614,00	
V3 Total Corticosteroides	Placebo	21,02	441,50	0,608
	Composición	22,93	504,50	
V3 Total Antihistamínicos	Placebo	22,50	472,50	0,563
	Composición	21,52	473,50	

10 Para valorar el efecto independiente del tratamiento con la composición probiótica de la invención respecto a otras variables que puedan influir en la puntuación SCORAD, se realiza un análisis de regresión lineal múltiple. En este análisis la variable SCORAD se introduce como variable dependiente. Además de la variable “tipo de tratamiento”, se introducen como variables de ajuste el “número total de días con antihistamínicos”, el “número total de días con corticoides” y la “puntuación SCORAD al inicio” del ensayo clínico.

15 Al mes del inicio del tratamiento, la única variable que se asocia de forma significativa con la puntuación SCORAD es el tipo de tratamiento. En ella, la asignación al grupo con tratamiento con la composición probiótica de la invención se asocia con un descenso absoluto en el SCORAD de 9,07 puntos. Es decir, que del total de descenso del SCORAD observado en el grupo tratado con la composición probiótica de la invención durante el primer mes, la composición de la invención es la responsable del sesenta y seis por ciento (66%) de este cambio (9,07 de 13,69 puntos de SCORAD). Ni la variable total de días con antihistamínicos, ni el total de días con corticoides muestran asociación con la puntuación SCORAD.

20 Por otro lado, el consumo de corticosteroides sistémicos se valora del mismo modo que se ha descrito para el análisis del consumo de corticosteroides tópicos, como variable secundaria preespecificada. Los resultados obtenidos para el consumo de corticosteroides sistémicos muestran que no existen diferencias significativas en el uso de dichos compuestos entre los dos grupos de tratamiento: composición de la invención vs placebo.

25 Los pacientes incluidos en el ensayo indicaron que sufrieron efectos adversos leves en forma de flatulencia los cinco primeros días de iniciar la ingesta de la composición de la invención en el treinta por ciento (30%) de los pacientes incluidos en dicho grupo respecto al catorce por ciento (14%) que sufrieron dichos efectos adversos en el grupo tratado con placebo.

30 Como conclusión, los resultados mostrados en el presente ejemplo ponen de manifiesto que la administración de la composición probiótica de la invención para el tratamiento de la DA muestra ventajas en términos de eficacia y tolerabilidad respecto a los pacientes tratados con el placebo. Así, de los parámetros analizados se pone de manifiesto que el índice SCORAD en los pacientes con DA tratados con la composición probiótica de la invención mejora significativamente respecto al grupo de pacientes tratado con el placebo. Dicha mejoría se observa desde el primer mes de ingesta de la composición probiótica de la invención, manteniéndose o aumentando dicha mejoría en posteriores análisis en el mes 2 y mes 3 de tratamiento.

35 Por otro lado, aunque la media en el número total de días en que los pacientes de los dos grupos tienen que usar corticoides tópicos es ligeramente mayor en el grupo que tomó la composición probiótica de la invención respecto al grupo placebo (3,3% vs 2,6%), dicha diferencia no es significativa. Por el contrario, cuando el análisis del consumo de corticoides se realiza a nivel de intra-sujeto o intra-grupo (comparando el uso de corticoides al inicio del estudio y al final del mismo dentro del mismo grupo), se observa una tendencia en el tiempo a un menor consumo de corticoides en el grupo que toma la composición probiótica de la invención (disminuye el consumo de corticoides en el cincuenta y cinco por ciento (55%) al compararlo con el grupo placebo (disminuye un ocho por ciento (8%) durante el periodo de seguimiento), alcanzando en este caso la significación estadística.

EJEMPLO 3. Análisis del efecto preventivo del uso de la composición probiótica de la invención en la aparición de brotes de DA.

5 De los veinte (20) pacientes con DA incluidos en el estudio, se realizó un análisis intermedio con aquellos que alcanzan un índice SCORAD de 6, haciendo un seguimiento específico a este grupo de pacientes hasta completar el total de tres meses de tratamiento. 10 pacientes recibieron placebo (Figura 11, línea negra) y 9 pacientes recibieron probiótico (Figura 11, línea gris).

10 La Figura 11 recoge los resultados de todos estos pacientes en el seguimiento del número de brotes de DA desde que terminan los 3 meses de tratamiento con el probiótico hasta 12 semanas después de haber finalizado ese tratamiento. Así, en la Figura 11 se muestra la evolución en el número de pacientes que padecen un nuevo brote de DA (Figura 11A), el número total de pacientes que presentan nuevos brotes de DA (Figura 11B), y el porcentaje de pacientes libre de nuevos brotes (Figura 11C); De todos los pacientes previamente tratados, en la Figura 11 se muestra que el número de brotes, número de pacientes y tanto por ciento de pacientes que sufren nuevos brotes en el periodo de 12 semanas sin tratamiento, es mayor entre los que previamente habían recibido placebo que entre los que previamente habían recibido probiótico.

20 Así, en este subgrupo de pacientes, aquéllos tratados con la composición probiótica de la invención presentaron un porcentaje de recaídas y/o empeoramiento menor que el grupo tratado con el placebo (1 de 10 (10%) vs 5 de 9 (55%)), respectivamente (Figura 11B).

Las diferencias entre los dos grupos de intervención son estadísticamente significativas en los tres meses de evaluación tras el inicio del seguimiento para las tres variables analizadas.

25 Los datos que avalan la eficacia del probiótico en términos de prevención en la aparición de nuevos brotes de DA son: en los tres meses posteriores a la suspensión del tratamiento con la composición probiótica anteriormente referida: los individuos que habían recibido el tratamiento con dicha composición tenían un menor número de brotes y, por lo tanto, un tiempo libre de enfermedad mayor que aquellos pacientes que no habían recibido el tratamiento.

30 Estos resultados ponen de manifiesto la eficacia que muestra el uso de la composición de la invención en la prevención de la aparición de nuevos brotes de DA. Así, en los tres meses posteriores a la suspensión del tratamiento con la composición probiótica de la invención, los pacientes que habían sido tratados con dicha composición mostraron un menor número de brotes y, por lo tanto, un tiempo libre de enfermedad mayor que aquellos pacientes que habían recibido el placebo.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición probiótica que comprende *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* (*B. lactis*), *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus casei*.
2. Composición probiótica según la reivindicación 1, en donde *B. lactis* es *B. lactis* CECT 8145, y/o *B. longum* es *B. longum* CECT 7347 y/o *L. rhamnosus casei* es *L. rhamnosus casei* CECT 9104.
- 10 3. Composición probiótica según la reivindicación 1 o 2, en donde la composición probiótica es una composición farmacéutica o una composición nutricional.
4. Composición probiótica según la reivindicación 3, en donde la composición farmacéutica comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. Composición probiótica según la reivindicación 3 o 4, en donde la composición farmacéutica está formulada para su administración en forma líquida o en forma sólida.
- 20 6. Composición probiótica según la reivindicación 5, en donde la formulación sólida se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, comprimidos para chupar, caramelos, comprimidos masticables, chicles, cápsulas, sobres, polvo, granulados, partículas recubiertas o comprimidos recubiertos, comprimidos y cápsulas gastrorresistentes y tiras y/o películas dispersables.
- 25 7. Composición probiótica según la reivindicación 5, en donde la formulación líquida se selecciona del grupo que consiste en soluciones orales, suspensiones, emulsiones y jarabes.
- 30 8. Composición probiótica según la reivindicación 3, en donde la composición nutricional es un alimento o un suplemento nutricional.
- 35 9. Composición probiótica según la reivindicación 8, en donde el alimento se selecciona del grupo que consiste en zumos de frutas o vegetales, helados, formulaciones infantiles, leche, yogur, queso, leche fermentada, leche en polvo, cereales, productos de repostería, productos en base de leche, producto cárnico y bebidas.
- 40 10. Composición probiótica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición comprende, adicionalmente, un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. y combinaciones de los mismos.
- 45 11. Composición probiótica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la concentración total de microorganismos de las cepas *B. lactis*, *L. casei* y *B. longum* en la composición es de entre 10^3 y 10^{12} ufc, preferiblemente, 10^9 ufc.
- 50 12. Composición probiótica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la concentración de *B. longum* con respecto a la concentración total de microorganismos presentes en la composición es de, al menos, entre el 30% y el 40%; la concentración de *B. lactis* con respecto a la concentración total de microorganismos es de, al menos, entre el 30% y el 40%; y/o la concentración de *L. casei* con respecto a la concentración total de microorganismos es, al menos, de entre el 25 y el 35%.
- 55 13. Composición probiótica según la reivindicación 12, en donde la concentración de *B. longum* con respecto a la concentración total de microorganismos presentes en la composición es del 35%; la concentración de *B. lactis* con respecto a la concentración total de microorganismos es del 35% y/o la concentración de *L. casei* con respecto a la concentración total de microorganismos es del 30%.
14. Composición probiótica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso como medicamento.
15. Composición probiótica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la dermatitis atópica.

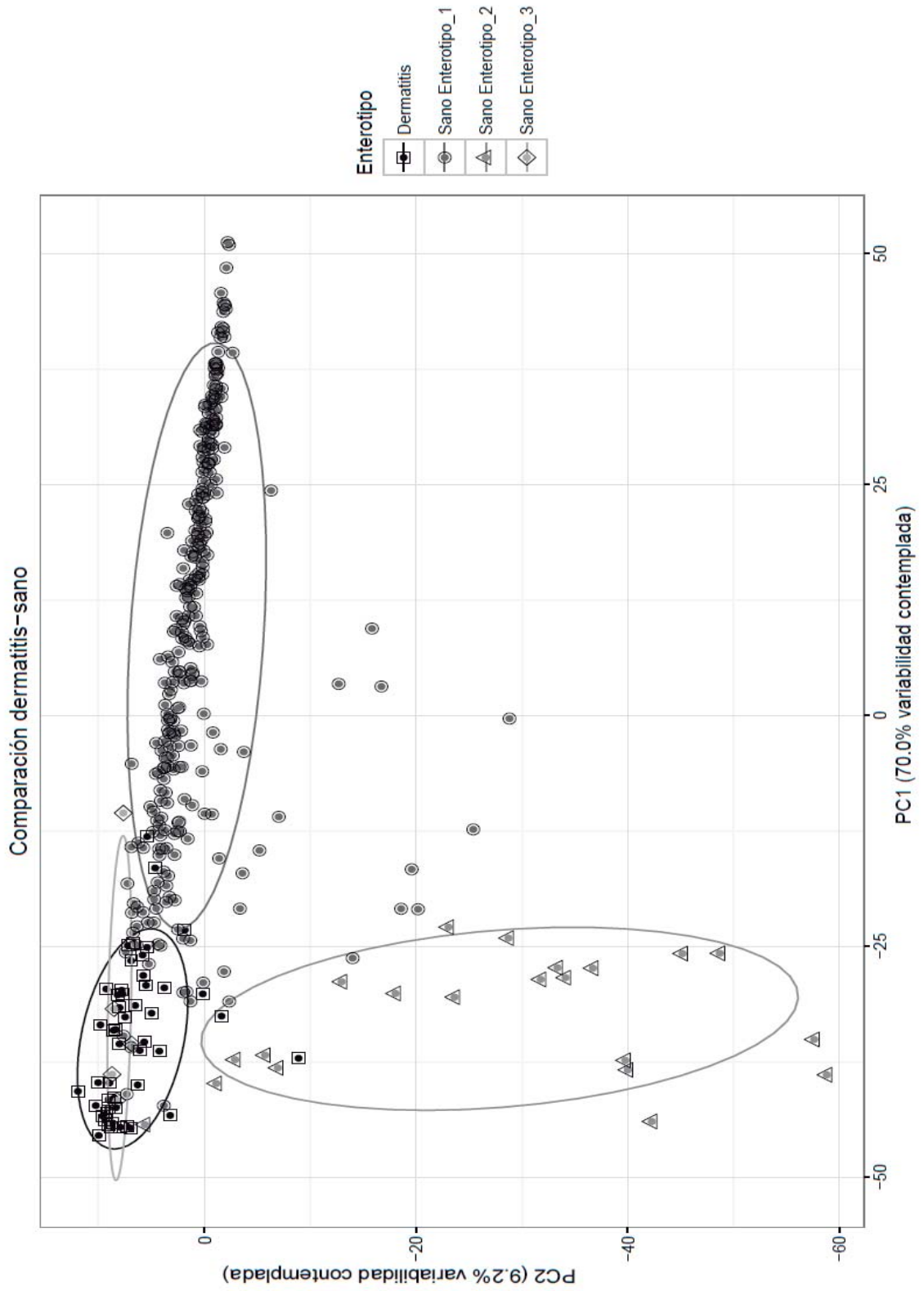


FIG. 1

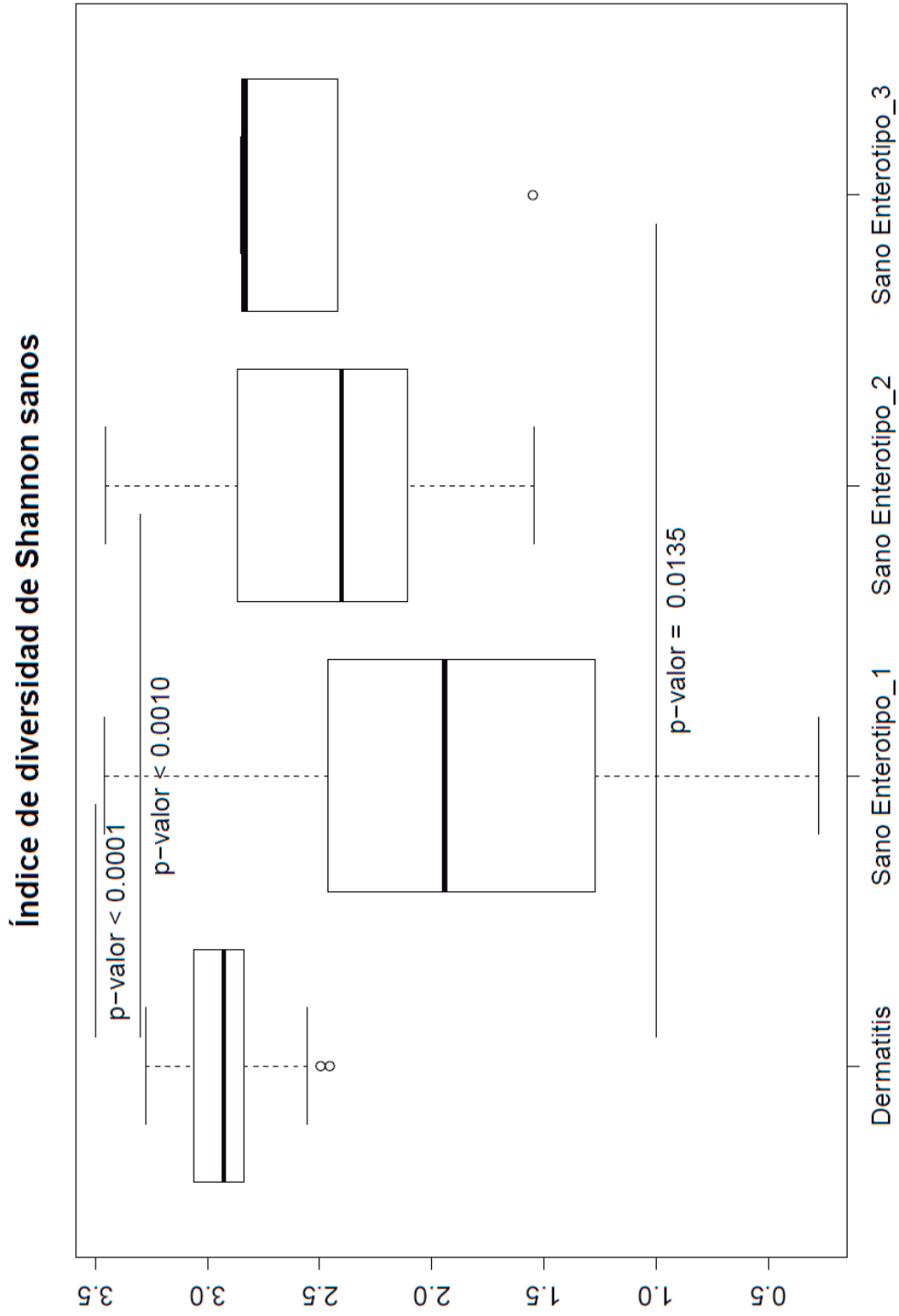


FIG. 2

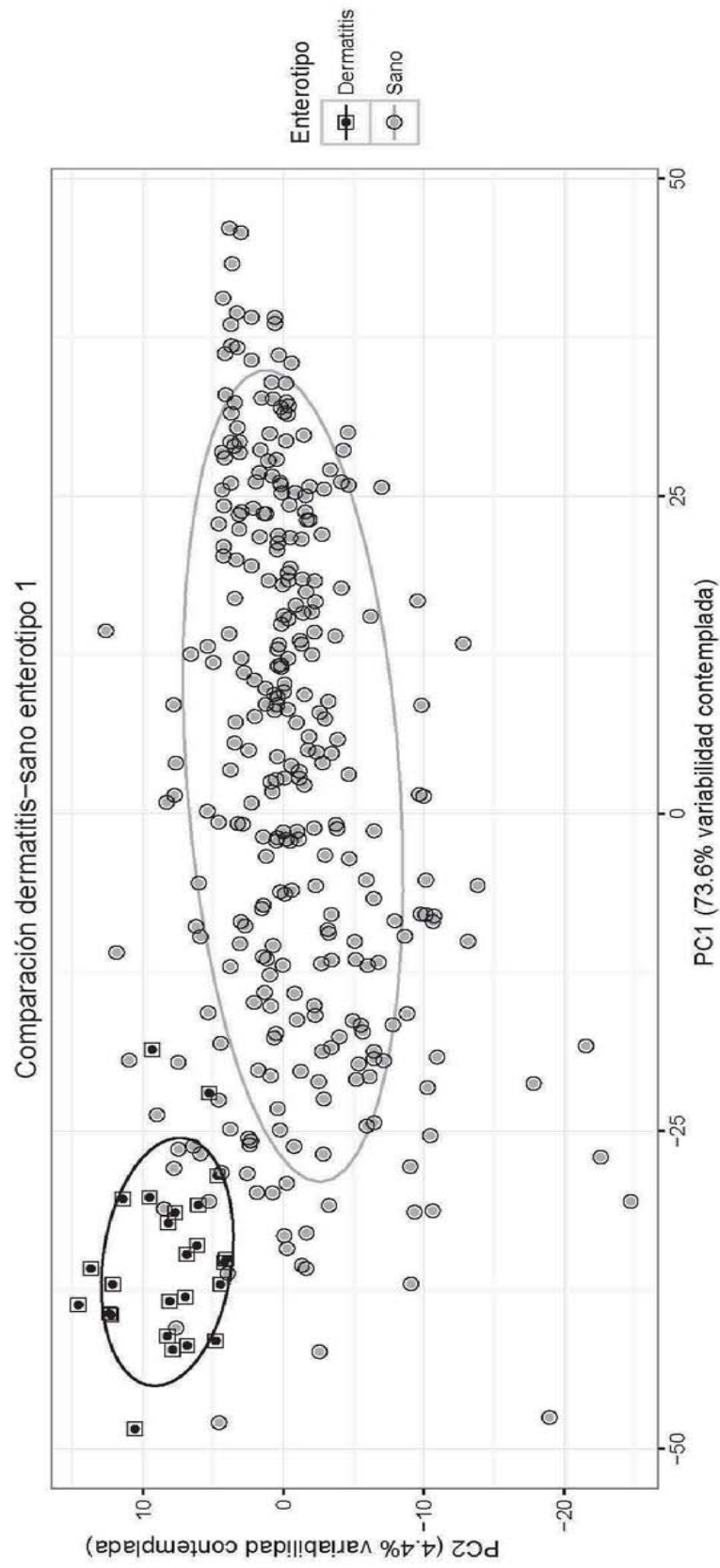


FIG. 3

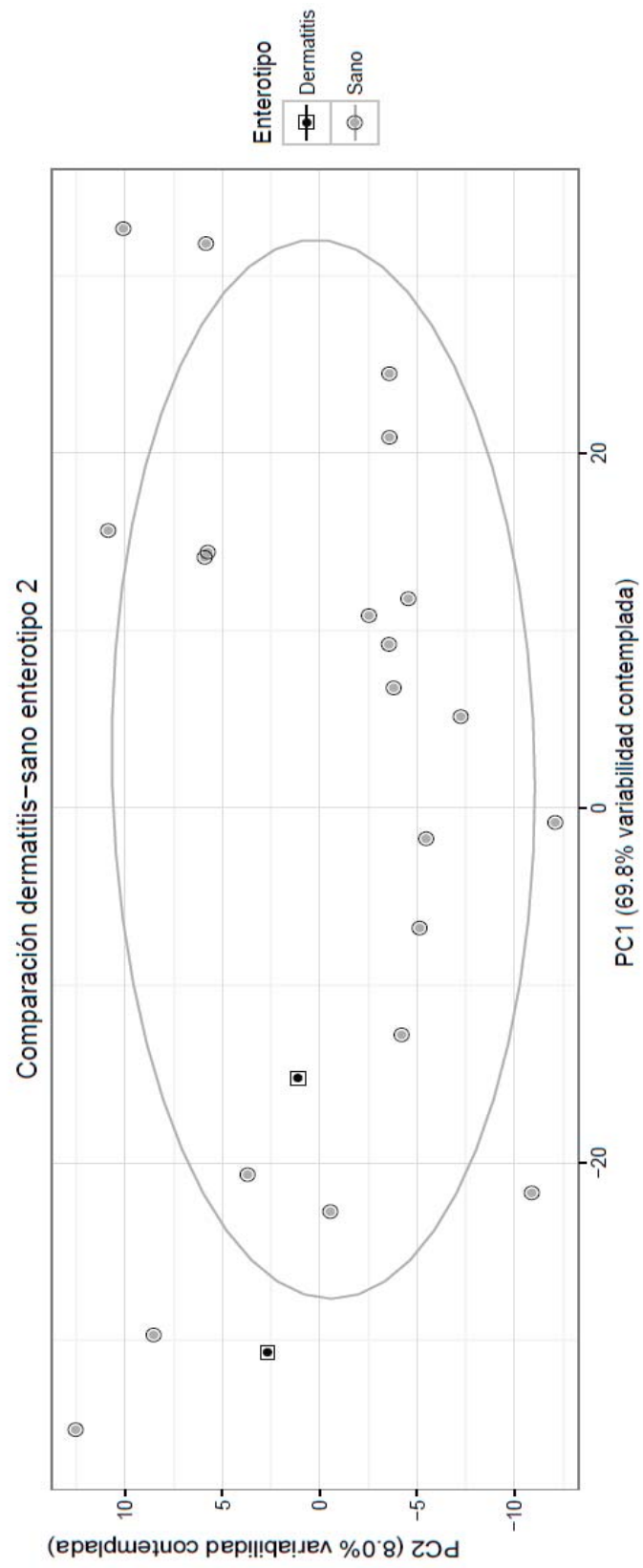


FIG. 4

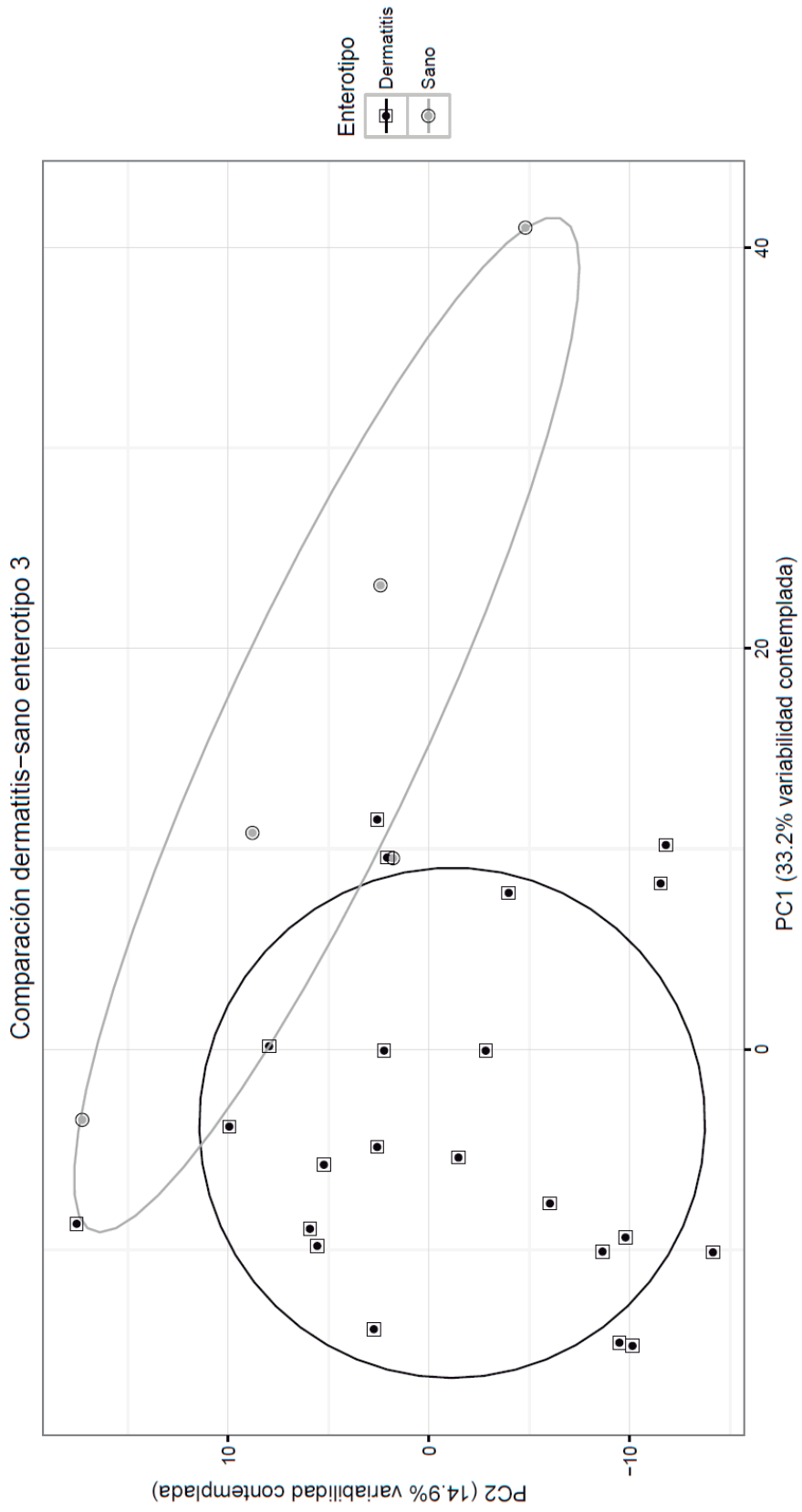
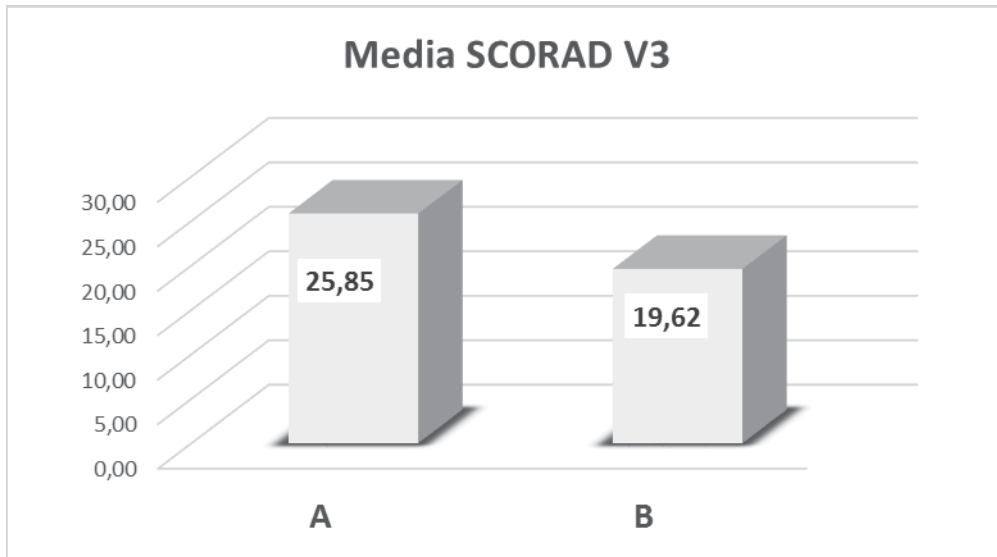


FIG. 5

A



B

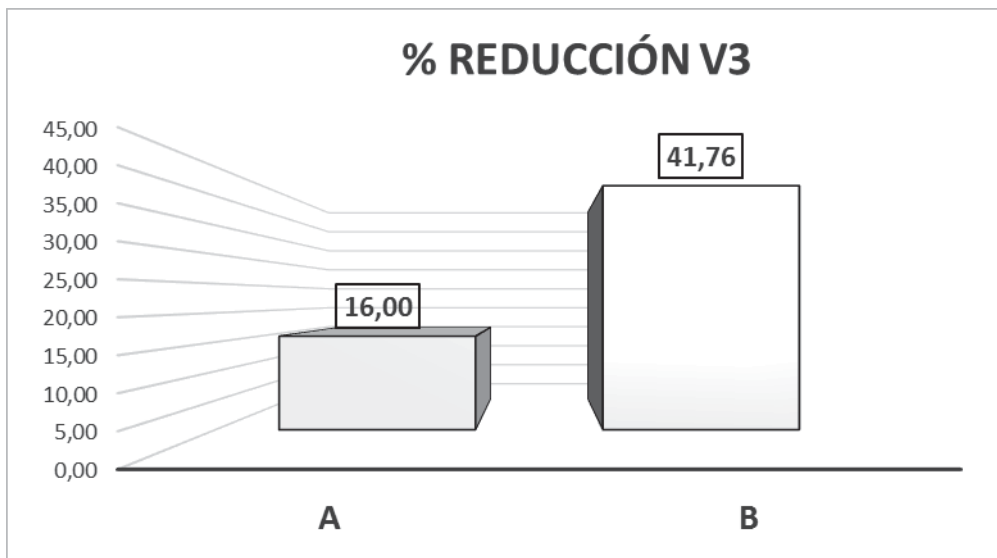
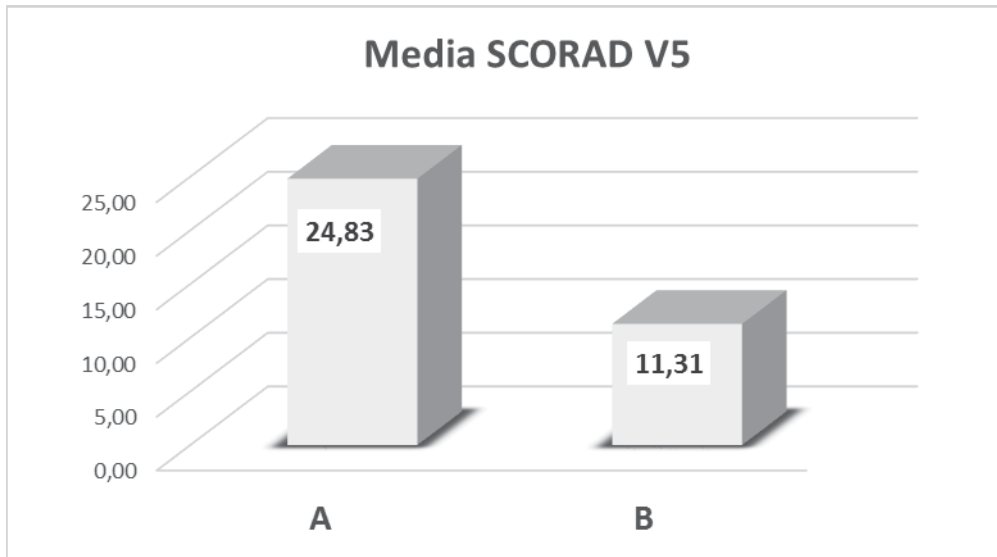


FIG. 6

A



B

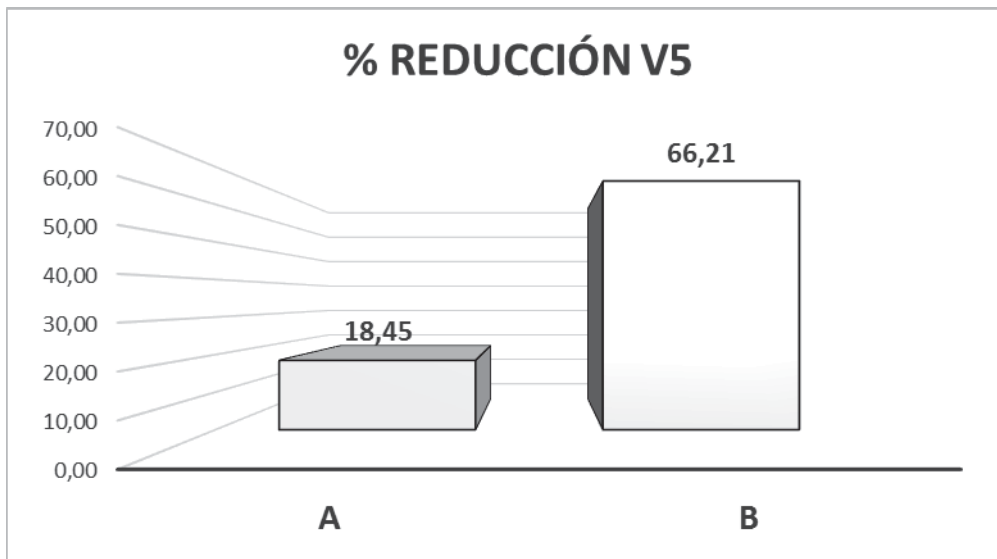
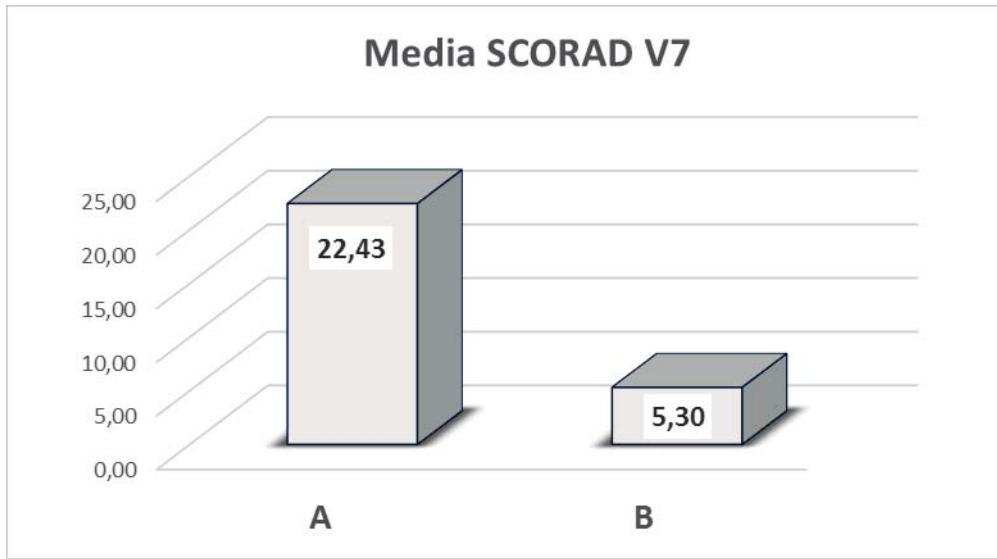


FIG. 7

A



B

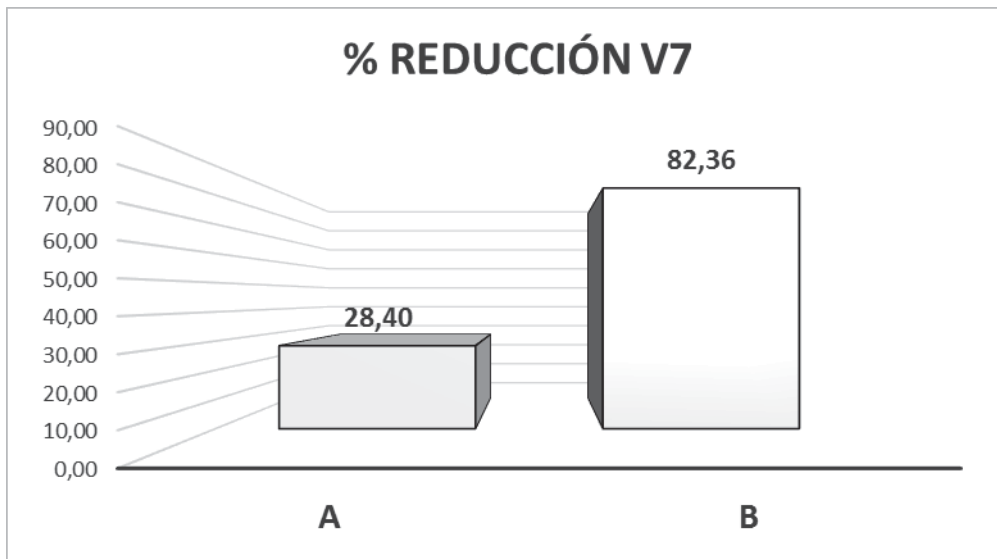


FIG. 8

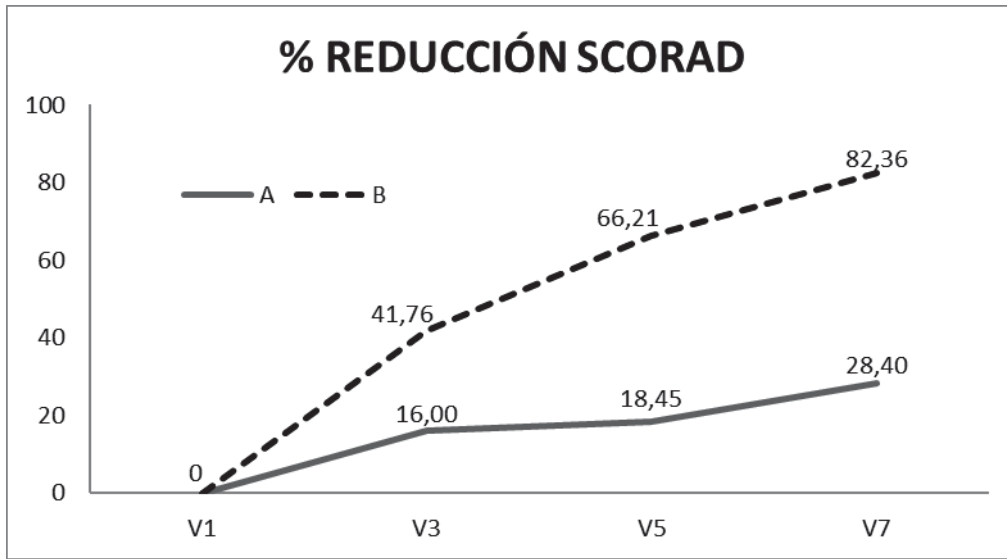


FIG. 9

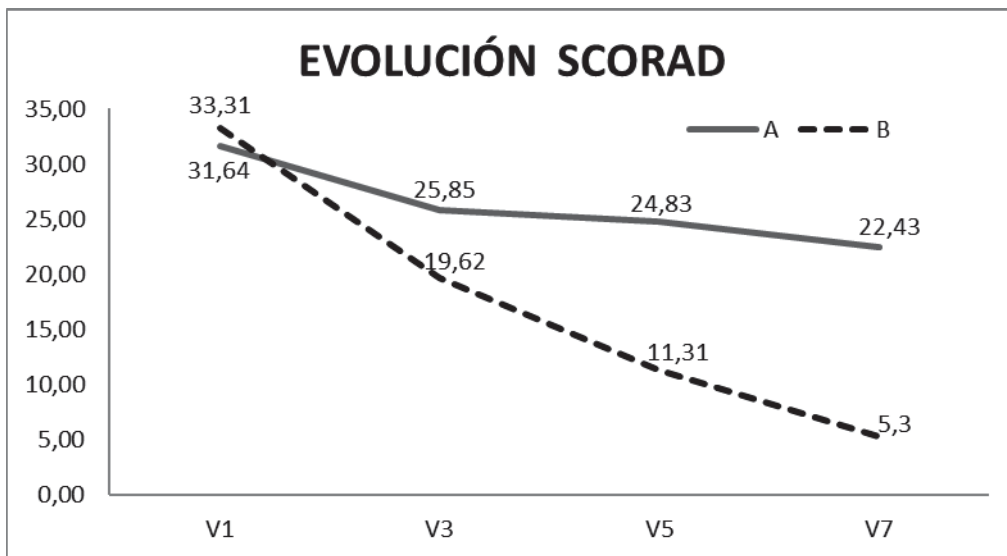


FIG. 10

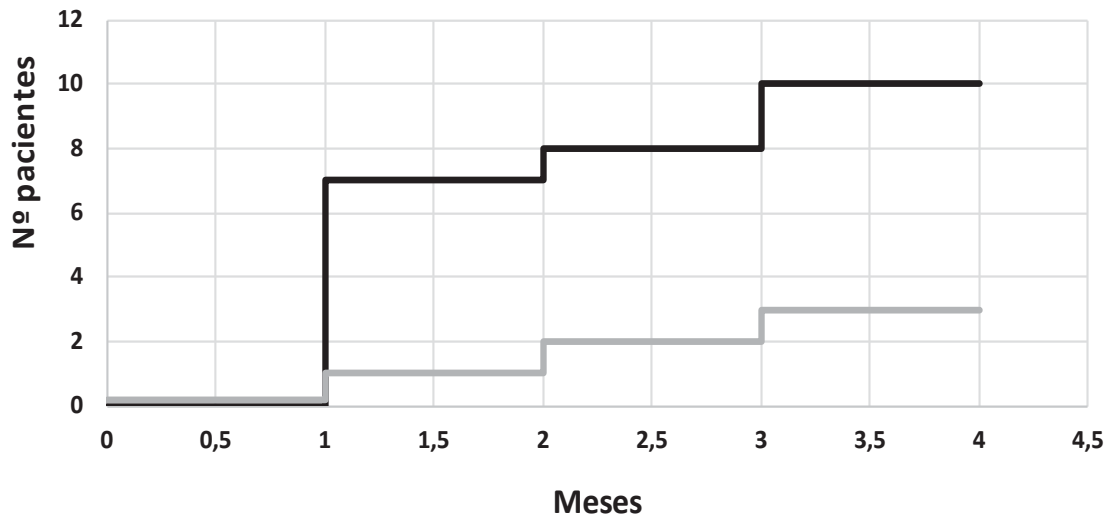


FIG 11A

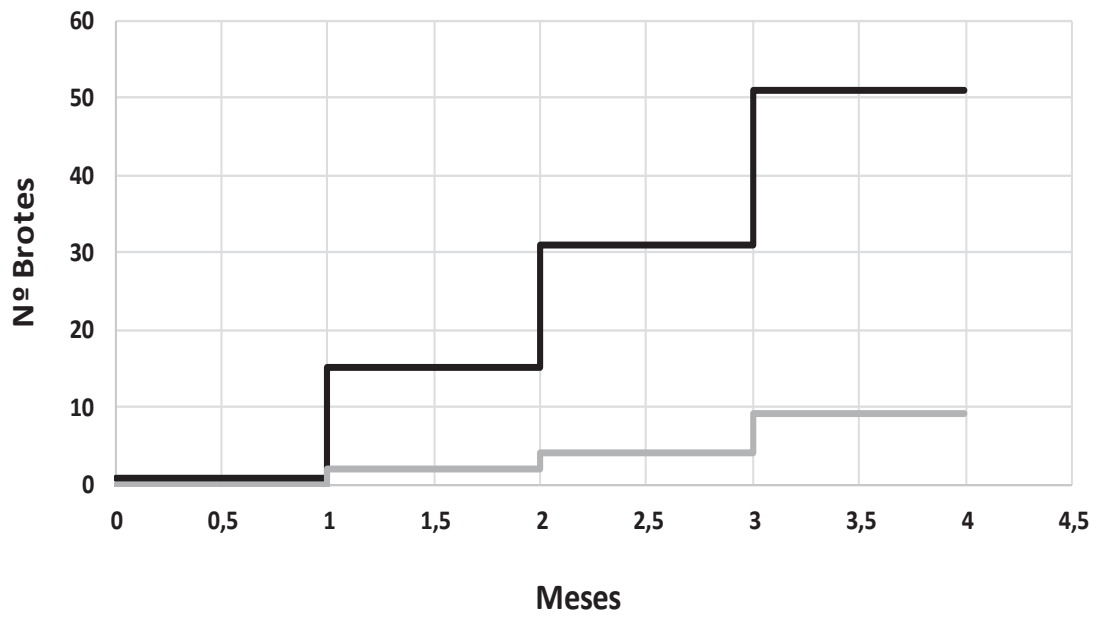


FIG 11B

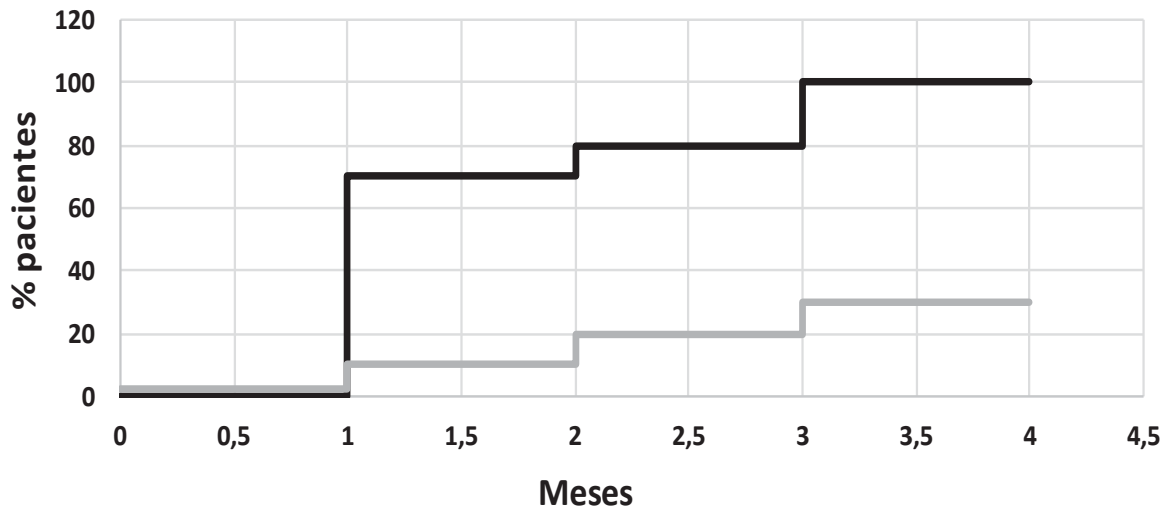


FIG 11C