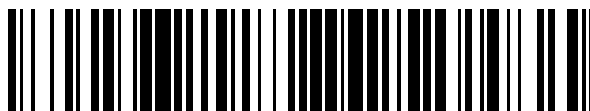


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 534**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2009 E 09724569 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2348890**

54 Título: **Probióticos para la utilización en mamíferos hembra gestantes para incrementar la inmunidad de su progenie**

30 Prioridad:

28.03.2008 EP 08153566

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

20.12.2013

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**BENYACOUB, JALIL;
BLUM-SPERISEN, STÉPHANIE;
ROCHAT, FLORENCE y
VON DER WEID, THIERRY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 435 534 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).

DESCRIPCION

Probióticos para la utilización en mamíferos hembra gestantes para incrementar la inmunidad de su progenie

5 La presente invención se refiere a la utilización de bacterias probióticas en la preparación de una composición nutricional para mamíferos hembra gestantes para incrementar el estatus inmunológico en su progenie recién nacida.

Antecedentes de la invención

10 El estatus inmunológico del neonato es una cuestión importante. Este estatus comprende la protección presente al nacer el neonato y la adquisición de dicha protección inmunológico durante las primeras horas, días o semanas de la vida del neonato. La capacidad de adquirir y mantener dicha protección es un factor crucial en la salud del recién nacido enfrentado a su nuevo ambiente. En el ser humano estas cuestiones son de la mayor importancia para la salud de la población.

15 Mantener las madres gestantes en un buen estado de salud durante la gestación es un factor clave para favorecer la salud de la progenie durante la gestión y después del nacimiento. Entre los factores de salud general que son conocidos se incluyen sus hábitos nutricionales, su ingesta de micronutrientes, su historia de infecciones y también se relaciona con su estatus inmunológico. Por ejemplo, las deficiencias en algunos minerales, vitaminas o sustancias (tales como el ácido fólico) puede afectar al desarrollo del feto y también afectar al desarrollo post-natal del neonato. La nutrición de la madre desempeña en este aspecto un papel clave en la salud futura de los neonatos y se han realizado muchos esfuerzos para monitorizar y mejorar el equilibrio nutricional de las madres gestantes. Los complementos alimentarios o simplemente las pautas generales de alimentación resultan esenciales en este aspecto.

20 Conjuntamente con las pautas generales de alimentación para las madres gestantes, ahora se conoce que algunos alimentos específicos pueden estimular la proliferación de una microbiota específica en el tracto gastrointestinal de la madre gestante. La microbiota equilibrada a su vez puede presentar un efecto sobre el huésped.

30 La utilización de prebióticos, es decir, sustancias nutricionales para mejorar la microbiota intestinal del huésped, se ha descrito en, por ejemplo, el documento WO nº 02/07533 por sus beneficios de salud en hembras.

35 Además, se ha reivindicado en el documento WO nº 2007/105945A que la alimentación de las madres gestantes con ingredientes prebióticos, especialmente determinado tipo de sacáridos no digeribles, podría mejorar la microbiota y/o el sistema inmunológico de la progenie.

40 La complementación de la ingesta nutricional con microorganismos, preferentemente microorganismos vivos, también se ha demostrado que mejora el equilibrio de la microbiota del tracto intestinal del huésped. La modulación de la microbiota del tracto intestinal por microorganismos vivos específicos se ha demostrado que proporciona efectos fisiológicos positivos particulares. Por ejemplo, la respuesta inmunológica inducida por tipos específicos de bacterias probióticas se ha estudiado y descrito ampliamente ("Cross talk between probiotic bacteria and the host immune system", The Journal of Nutrition, Blaise Corthesy et al., suplemento, páginas 781S-790S, 2007). Tal como se ha descrito en la literatura científica, se ha demostrado más particularmente que cepas específicas de microorganismos presentan efectos beneficiosos. Son ejemplos generalmente conocidos de familias que se ha demostrado que presentan efectos probióticos, Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus y Lactobacillus caseii.

50 Se ha planteado la hipótesis de que los probióticos, al igual que otros comensales, influyen sobre las funciones inmunológicas del huésped mediante la modulación de la composición y/o la actividad metabólica de la microbiota, o mediante una interacción directa con el sistema inmunológico subyacente a la mucosa intestinal. Tras esta interacción, se activan las funciones inmunológicas, tal como refleja la liberación de mediadores inmunológicos (citoquinas), la producción de anticuerpos y la activación de linfocitos, así como otras células inmunológicas. Estas células activadas, citoquinas y/o compuestos bacterianos ejercen funciones moduladoras inmunológicas en diferentes sitios del cuerpo a través de la circulación sanguínea. A este respecto, se postula que un efecto beneficioso sobre el estatus inmunológico de la madre mediante la complementación probiótica ya podría influir sobre el desarrollo inmunológico fetal. Además, también es conocido que las células inmunológicas y otros factores bioactivos originados en el intestino de la madre podrían ser transportados a la leche mamaria mediante una ruta enteromamaria de transporte y transmitirse al neonato durante la lactancia. Por lo tanto, se justifica plantear además la hipótesis de que la provisión de un complemento a las madres gestantes podría estimular un enriquecimiento de la leche mamaria en factores inmunológicos que contribuirían al desarrollo inmunológico neonatal.

60 Garantizar un futuro saludable de la progenie es una necesidad bien reconocida. Más concretamente, garantizar un desarrollo y maduración óptimos del sistema inmunológico de la progenie resulta de la mayor importancia.

Convencionalmente, aparte de los tratamientos médicos en respuesta a condiciones médicas específicas, se enfatiza un buen equilibrio nutricional de las madres gestantes. Sin embargo, no se conoce bien cómo incrementar específicamente el estatus inmunológico de la progenie durante el periodo de gestación.

5 Sin embargo, existe una necesidad de una etapa adicional de garantizar el futuro saludable de la progenie utilizando los últimos resultados sobre nutrición.

Por lo tanto, existe una necesidad de impactar positivamente sobre la salud de la progenie mediante una dieta nutricional dirigida de las madres gestantes.

10 En particular existe una necesidad de ayudar a garantizar un sistema inmunológico óptimo en la progenie con el fin de prepararla mejor para los retos antigénicos en los primeros años de vida, así como para incrementar la futura maduración de su sistema inmunológico con el fin de estimular mejor su protección durante la infancia posterior.

15 Existe una necesidad de impactar sobre la construcción del sistema inmunológico de la progenie en el estadio más precoz posible durante toda la gestación, así como durante las primeras etapas de la vida del neonato, cuando el sistema inmunológico está madurando rápidamente.

20 Existe una necesidad de reforzar la capacidad del sistema inmunológico de la progenie de reaccionar frente a antígenos en general y frente a enfermedades infecciosas en particular.

Existe una necesidad de proporcionar estos beneficios por medios que sean tanto eficientes como faltos de un impacto negativo sobre las madres gestantes y/o su progenie.

25 Descripción resumida de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones.

30 En un primer aspecto, la presente invención proporciona la utilización de probióticos en mamíferos hembra gestantes en la preparación de una composición para la administración oral con el fin de reforzar la inmunidad de su progenie tras el nacimiento, caracterizados porque dichos probióticos son *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724.

35 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona la utilización de los probióticos reivindicados durante el periodo de gestación y/o durante el periodo de lactancia de la progenie.

En otro aspecto de la invención, los probióticos se administran en o con bebidas alimentarias de complemento dietético o composiciones farmacéuticas, para la madre gestante, y conjuntamente con otros ingredientes activos, tales como prebióticos.

40 La invención se extiende además a la composición utilizada mediante los métodos anteriormente indicados para el propósito indicado.

Breve descripción de los dibujos

45 Las figuras 1 y 3 subrayan esquemáticamente los procedimientos experimentales de los estudios 1 y 2, descritos respectivamente.

Las figuras 2 y 4 muestran los resultados de estudios que indican un refuerzo inmunológico en la progenie.

Descripción detallada de la invención

50 Definiciones: en la presente memoria, las expresiones siguientes presentan los significados siguientes:

55 "mamíferos hembra gestantes" son mamíferos hembra que presentan por lo menos un ovocito fecundado en desarrollo en su útero. Preferentemente, la presente invención considere seres humanos femeninos (es decir, madres o futuras madres).

60 "Probiótico" se refiere a preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del huésped (Salminen S., Ouwehand A., Benno Y. et al., "Probiotics: how should they be defined", Trends Food Sci. Technol. 10:107-10, 1999). El probiótico puede comprender una única cepa de microorganismo o una mezcla de diversas cepas y/o una mezcla de diversos microorganismos. En el caso de mezclas, todavía puede utilizarse el término singular "probiótico" para referirse a la mezcla o preparación probiótica.

"Prebiótico" se refiere de manera general a un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de los microorganismos presentes en el intestino del huésped, y que de esta manera intenta mejorar la salud del huésped.

5 "Progenie" se refiere al ser recién nacido o que va a nacer de mamíferos hembra sujeto. En particular, incluye la progenie todavía en gestación. Preferentemente, la presente invención considera la etapa juvenil/etapa infantil (es decir hasta la adolescencia en el ser humano; 12 a 14 años), más preferentemente la presente invención se refiere al estatus inmunológico de la progenie en la primera infancia (hasta los 2 a 4 años de edad en el ser humano).

10 Los inventores han encontrado que la administración de probióticos en mamíferos hembra gestantes puede impactar el sistema inmunológico de la progenie, y más particularmente puede reforzar el sistema inmunológico de la progenie, de manera que permita una respuesta mejor y más fuerte del sistema inmunológico tras la exposición a antígenos. La modulación del sistema inmunológico de la progenie puede tener lugar muy pronto en la vida intrauterina o en una etapa temprana de la vida extrauterina, cuando está madurando el sistema inmunológico.

15 Los inventores han puesto de manifiesto el efecto de refuerzo en ausencia de un contacto directo evidente entre el sistema intestinal de la progenie y la composición de probióticos administrada en las hembras gestantes, es decir, durante la vida intrauterina de la progenie.

20 Además, los inventores han encontrado que dicha composición que comprende probióticos también puede presentar un efecto beneficioso sobre el sistema inmunológico de la progenie durante el periodo de lactancia.

25 Sin respaldo teórico, se conjetura que la colonización parcial del tracto intestinal de las hembras gestantes por el probiótico induce la creación de una señal molecular. Se cree que la progenie recibe y reacciona a esta señal molecular. Se cree además que el sistema inmunológico de la progenie resulta afectado por esa señal. La señal presenta un efecto positivo sobre la maduración del sistema inmunológico de la progenie. Ello puede conducir a una mejor capacidad de responder a los antígenos tras el nacimiento. Se especula además que la señal puede transmitirse a la progenie durante el periodo de lactancia, más concretamente en el caso de que se produjese un precondicionamiento frente a la señal durante el periodo de gestación de la progenie.

30 Hembras gestantes.

35 La utilización y la composición de la presente invención se lleva a cabo y se administra en mamíferos hembra gestantes, es decir, hembras que van a dar a luz a progenie. La utilización considerada por la presente invención se extiende desde la concepción de la progenie (fecundación), pasando por el periodo de gestación completo, hasta el alumbramiento de la progenie. También puede extenderse desde el periodo de lactancia hasta el destete. También se encuentra comprendida en la presente invención el destete parcial, hasta el final definitivo de la lactancia. No se excluye que la utilización considerada por la invención se extienda además al periodo inmediatamente anterior a la fecundación que presente un impacto sobre el estado de salud de las hembras, e indirectamente sobre el estado de salud de la progenie.

40 Los mamíferos pueden ser hembras humanas gestantes. En este caso, el periodo de gestación es de aproximadamente 9 meses y el periodo de lactancia puede variar considerablemente según los hábitos, cultura y estado de salud de las hembras. Los mamíferos hembra también pueden ser otros mamíferos hembra, incluyendo caballos y animales de compañía tales como gatos y perros. Otros mamíferos hembra gestantes no se encuentran excluidos de la presente invención.

Microorganismos probióticos

50 Los microorganismos probióticos considerados por la presente exposición pueden incluir cualquier probiótico seleccionado de entre el grupo que comprende Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus y Saccharomyces o mezclas de los mismos, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste de Bifidobacterium longum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus reuteri, Enterococcus faecium, Streptococcus sp. y Saccharomyces boulardii o mezclas de los mismos. Otros microorganismos probióticos no se encuentran excluidos de la presente exposición con la condición de que puedan proporcionar el efecto de refuerzo inmunológico descrito.

60 Más preferentemente, el probiótico se selecciona de entre el grupo que comprende Lactobacillus rhamnosus CGM-CC 1.3724 (sobrenombre NCC4007 y LPR), Bifidobacterium lactis CNCM I-3446, comercializado entre otros por la compañía Christian Hansen de Dinamarca bajo la marca comercial Bb12 (sobrenombre NCC2818), Bifidobacterium longum ATCC BAA- 999, comercializado por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón bajo la marca comercial BB536, Lactobacillus johnsonii CNCM I-1225 (sobrenombre NCC533 y La1), Lactobacillus fermentum VRI 003

comercializado por Probiomics (Australia) bajo la marca comercial PCC, Bifidobacterium longum CNCM I-2170, Bifidobacterium breve, comercializado por Danisco (Dinamarca) bajo la marca comercial Bb- 03, Bifidobacterium breve, comercializado por Morinaga (Japón) bajo la marca comercial M- 16V, y la cepa de Bifidobacterium breve comercializada por Institut Rosell (Lallemand, Canada) bajo la marca comercial R0070, Lactobacillus paracasei CNCM I-1292, Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103, obtenible entre otros de Valio Oy de Finlandia bajo la marca comercial LGG, Enterococcus faecium SF 68, y mezclas de los mismos. Un probiótico preferente es Lactobacillus rhamnosus CGMCC 1.3724.

Dosis de probiótico.

El probiótico puede encontrarse presente en la composición en un amplio intervalo de %, con la condición de que el probiótico específico utilizado proporcione el efecto de refuerzo de la inmunidad descrito. Sin embargo, preferentemente, el probiótico se encuentra presente en la composición en una cantidad equivalente de entre 10^3 y 10^{10} cfu/g de composición seca (cf=unidad formadora de colonia). Esta expresión incluye las posibilidades de que las bacterias se encuentren vivas, inactivadas o muertas, o incluso presentes como fragmentos tales como ADN o materiales de la pared celular. En otras palabras, la cantidad de bacterias que contiene la fórmula se expresa en términos de la capacidad de formación de colonias de esa cantidad de bacterias, tal como si todas las bacterias se encontrasen vivas con independencia de que, de hecho, se encuentren vivas, inactivadas o muertas, fragmentadas o una mezcla de cualquiera o todos estos estados. Preferentemente, el probiótico se encuentra presente en una cantidad equivalente a entre 10^4 y 10^9 cfu/g de composición seca, todavía más preferentemente en una cantidad equivalente a entre 10^6 y 10^8 cfu/g de composición seca.

Método de administración.

La composición puede administrarse en las hembras gestantes por diversos medios, con la condición de que induzca un contacto entre la composición y el tracto gastrointestinal de las hembras. Preferentemente, la composición se administra como parte del alimento, bebida o complementos alimentarios de las hembras. La composición también puede administrarse en una composición farmacéutica. Preferentemente, la administración es oral o entérica. La administración oral es más preferente, ya que presenta un impacto menos traumático sobre las hembras. Sin embargo, en condiciones patológicas o en el caso de que se utilice la alimentación entérica, la administración de la composición puede añadirse a la alimentación entérica.

Administración con otros compuestos.

En cualquier caso, la composición puede administrarse sola (pura o diluida en agua, por ejemplo) o en una mezcla con otros compuestos (tales como complementos alimentarios, complementos nutricionales, medicinas, portadores, saborizantes, ingredientes digeribles o no digeribles). Las vitaminas y minerales son ejemplos de complementos alimentarios típicos. En una realización preferente, la composición se administra conjuntamente con otros compuestos que potencian el efecto descrito sobre la inmunidad de la progenie. Dichos compuestos sinérgicos pueden ser un portador o una matriz que facilite la administración de los probióticos en el tracto intestinal de la hembra, preferentemente en una forma activa. Dichos compuestos sinérgicos también pueden afectar al estado de salud o al metabolismo de la hembra gestante, de manera que incrementen el efecto de la composición sobre el sistema inmunológico de la progenie. Dichos compuestos sinérgicos pueden ser otros compuestos activos que influyan sinérgica o separadamente sobre la respuesta inmunológica del bebé y/o potencien el efecto del probiótico. Un ejemplo de estos compuestos sinérgicos es la maltodextrina. Uno de los efectos de la maltodextrina es proporcionar un portador para el probiótico, incrementando su efecto, y evitando la agregación. Entre otros ejemplos se incluyen compuestos prebióticos conocidos, tales como compuestos carbohidratos seleccionados de entre el grupo que consiste de inulina, fructooligosacárido (FOS), fructooligosacárido de cadena corta (FOS de cadena corta), galacto-oligosacárido (GOS), xilo-oligosacárido (XOS), gangliósido, goma guar parcialmente hidrolizada (PHGG), goma acacia, goma de soja, leche con bayas de goji ("Lactowolfberry"), extractos de bayas de goji o una mezcla de los mismos. Pueden encontrarse presentes otros carbohidratos, tales como un segundo carbohidrato que actúe sinérgicamente con el primer carbohidrato y que se selecciona de entre el grupo que consiste de xilooligosacárido (XOS), goma, goma acacia, almidón, goma guar parcialmente hidrolizada o una mezcla de los mismos.

El carbohidrato o carbohidratos pueden encontrarse presentes en una cantidad de entre aproximadamente 1 y 20 g, o 1% a 80%, ó 20% a 60% de las dosis diarias de la composición. Alternativamente, los carbohidratos se encuentran presentes en 10% a 80% de la composición seca. Sin embargo, en cualquier caso la dosis diaria de carbohidrato debe satisfacer las directrices de seguridad publicadas y los requisitos legales. Para niños, un límite típico, por ejemplo, es un máximo de 6 g/l/día.

En un caso de la presente exposición, una composición nutricional preferentemente comprende una fuente de proteínas. Resulta preferente la proteína alimentaria como fuente de proteínas. La proteína alimentaria puede ser

cualquier proteína alimentaria adecuada, por ejemplo proteína animal (tal como proteína láctea, proteína cárnica o proteína de huevo), proteína vegetal (tal como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante), una mezcla de aminoácidos libres, o una combinación de los mismos. Resultan particularmente preferentes las proteínas lácteas tales como la caseína, las proteínas de suero y las proteínas de soja.

5 La composición puede comprender además una fuente de carbohidratos y/o una fuente de grasas.

10 En el caso de que la composición de la invención sea una composición nutricional e incluya una fuente de grasas, la fuente de grasas preferentemente proporciona entre aproximadamente 5% y aproximadamente 55% de la energía de la composición nutricional; por ejemplo, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 50% de la energía. Los lípidos que constituyen la fuente de grasas pueden ser cualquier grasa o mezcla de grasas adecuada. La grasa vegetal resulta particularmente adecuada; por ejemplo el aceite de soja, el aceite de palma, el aceite de coco, el aceite de cártamo, el aceite de girasol, el aceite de maíz, el aceite de canola, la lecitina y similares. También puede añadirse grasa animal, tal como grasa láctea, si se desea.

15 Puede añadirse una fuente adicional de carbohidrato a la composición nutricional. Preferentemente proporciona entre aproximadamente 40% y aproximadamente 80% de la energía de la composición nutricional. Puede utilizarse cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrina o una mezcla de los mismos.

20 También puede añadirse fibra alimentaria adicional si se desea. En caso de añadirse, preferentemente comprende hasta aproximadamente 5% de la energía de la composición nutricional. La fibra alimentaria puede ser de cualquier origen adecuado, incluyendo, por ejemplo, soja, guisante, avena, pectina, goma guar, goma acacia, fructooligosacárido o una mezcla de los mismos.

25 Pueden incluirse vitaminas y minerales adecuados en la composición nutricional en una cantidad suficiente para cumplir las directrices apropiadas.

30 Puede incluirse uno o más emulsionantes de grado alimentario en la composición nutricional si se desea; por ejemplo ésteres de ácido diacetil-tartárico de mono- y diglicéridos, lecitina y mono- o diglicéridos o una mezcla de los mismos. Pueden incluirse sales y/o estabilizadores similarmente adecuados. Pueden añadirse saborizantes a la composición.

35 Periodo de administración.

El periodo de administración se inicia con la fecundación o tan pronto como resulte posible después de la fecundación (tras tener constancia la madre de su embarazo). Sin embargo, el periodo de administración también puede iniciarse antes. Por ejemplo, el periodo de administración puede preceder a la fecundación en 1 ó 2 meses. En este caso, se cree que el estado de salud de la madre que será fecundada presenta un impacto sobre el estado de salud de la futura progenie. El periodo de administración también puede iniciarse relativamente tarde durante el embarazo, preferentemente en el mes 3, 5 ó 7 del embarazo (al considerar hembras humanas) o en periodos correspondientes para otros mamíferos. También puede considerarse un inicio muy tardío de la administración de la composición, es decir, en el mes 8 ó 9 ó en torno a estos meses (unas cuantas semanas antes del nacimiento). En este caso, se conjetura que el efecto sobre el sistema inmunológico de la progenie es un efecto a corto plazo y rápido, preparándola mejor para su exposición a antígenos tras el nacimiento. El periodo de administración puede ser continuo (por ejemplo hasta la lactancia, inclusive, y hasta el destete) o discontinuo. Preferentemente, el periodo de administración es continuo para un efecto más prolongado. Sin embargo, se conjetura que un patrón discontinuo (por ejemplo la administración diaria durante 1 semana cada mes) puede proporcionar "señales discontinuas de refuerzo inmunológico" 1ue induzcan efectos positivos en la progenie. La duración de la administración puede variar. Mientras que se esperan efectos positivos con una duración relativamente corta de la administración (por ejemplo la administración diaria durante 1 semana ó 1 mes), se cree que duraciones más largas proporcionan un efecto mejorado (por ejemplo una duración de 3, 5 ó 8 meses en el ser humano, y periodos correspondientes en otros mamíferos). Preferentemente, el periodo de administración cubre sustancialmente la duración completa del periodo de gestación. En una realización cubre más de 50%, más de 70%, o más de 80% del periodo de gestación. La duración de la administración también puede cubrir la totalidad o una parte del periodo de lactación. Más preferentemente también cubre la duración completa del periodo de lactancia. La duración puede cubrir 0%, 30% o más, 50% o más ó 80% o más del periodo de lactancia. En una realización particular, el periodo de administración de la composición puede cubrir el periodo de lactancia (la totalidad o parte del mismo) pero no el periodo de gestación; en este caso, los beneficios de la composición se transmiten por la leche materna a la progenie. Más preferentemente, el periodo de administración cubre una parte (o la totalidad) del periodo de gestación y parte (o la totalidad) del periodo de lactancia. Preferentemente, la administración se lleva a cabo en la ingesta diaria (que debe ingerirse una o dos veces al día) o en la ingesta semanal (que debe ingerirse una o dos veces a la semana).

En un caso de la presente exposición, la composición se administra también directamente en la progenie con la condición de que la madre haya recibido la composición durante la gestación. Preferentemente, la composición se administra más preferentemente por vía oral, directamente en la progenie durante la lactancia o tras el destete parcial o total. La doble exposición de la madre (durante la gestación) y de la progenie (administración directa) a la composición puede efectivamente proporcionar beneficios mejorados de un modo sinérgico. Se conjetura que la exposición durante la gestación induce un preacondicionamiento de la progenie para mejorar su respuesta a la administración directa posterior.

Efecto de la composición.

La composición de la invención administrada en los mamíferos hembra gestantes induce el refuerzo de la inmunidad de la progenie. Ese refuerzo resulta particularmente medible tras el nacimiento, aunque puede iniciarse durante el periodo de gestación.

Concretamente, la expresión "refuerzo de la inmunidad" utilizado excluye las respuestas alérgicas. La expresión "refuerzo de la inmunidad" se define como el refuerzo de las funciones inmunológicas innatas y la estimulación de una respuesta inmunológica específica frente a antígenos. La respuesta inmunológica innata pueden ser respuestas celulares, actividad fagocítica, actividad leucocítica y/o anticuerpos polirreactivos. La respuesta inmunológica específica puede ser la activación celular y/o respuestas específicas de anticuerpos. La expresión "refuerzo de la inmunidad" puede comprender o puede definirse como el incremento de las defensas inmunológicas del cuerpo y/o el incremento de la capacidad del cuerpo de responder a retos antigénicos infecciosos. Dichos retos antigénicos pueden ser agentes víricos y/o bacterianos y/o parasitarios o sus derivados, subunidades, compuestos de superficie celular y/o toxinas antigénicos.

En un caso particular, la composición de la invención refuerza la transmisión de competencias inmunológicas de dichas hembras a dicha progenie. Con este refuerzo la composición puede proporcionar a la progenie mayores posibilidades de resistir los retos de su vida temprana. En definitiva la composición ayuda a la progenie a que disfrute de un mejor inicio en la vida y/o a encontrarse más protegida frente a las infecciones.

En un caso particular, dicho efecto de refuerzo es un incremento de la capacidad de la progenie de responder a una exposición antigénica. En el momento del nacimiento el sistema inmunológico del recién nacido se encuentra tanto en un estado que le permite responder adecuadamente a las exposiciones antigénicas como en un estado de maduración rápida. La exposición a antígenos participa además en el incremento de la maduración del sistema inmunológico. Tras el nacimiento, todos los bebés se encuentran expuestos naturalmente a antígenos ambientales o patógenos. El sistema inmunológico de la progenie responde a dicha exposición. En una realización de la presente invención, el sistema inmunológico de la progenie es capaz de responder de una manera más eficiente a la exposición a los antígenos. En un caso particular, la respuesta a la exposición antigénica puede medirse a partir de la dosis de anticuerpos específicos para dicho antígeno. En el contexto de la invención, puede medirse una elevación cuantitativa, así como cualitativa, de los anticuerpos específicos. En un caso particular, dicha elevación puede medirse en el suero y/o en la saliva y/o en las heces de la progenie expuesta a los antígenos. En un caso particular, la respuesta a la exposición antigénica comprende una elevación de los anticuerpos polirreactivos totales, preferentemente en el suero y/o en la saliva y/o en las heces de la progenie. En una realización, la respuesta a la exposición antigénica comprende una elevación de la respuesta inmunológica celular en la sangre de la progenie, preferentemente un incremento del número y/o un incremento de la actividad de los leucocitos de dicha progenie (a título ilustrativo ver los resultados en el Ejemplo 2). Se entiende que el tipo de respuesta es altamente dependiente del tipo de exposición, aunque algunos antígenos pueden inducir una respuesta inmunológica compleja medible mediante más de uno de los efectos anteriormente citados (por ejemplo la elevación de anticuerpos específicos y la elevación de anticuerpos polirreactivos, y/o la elevación de una respuesta inmunológica celular). La medición de la respuesta inmunológica puede llevarse a cabo mediante métodos de inmunoensayo convencionalmente conocidos, tales como los recuentos celulares, los ensayos de anticuerpos, la actividad fagocítica, así como la actividad de células citotóxicas (la actividad de neutrófilos y de células asesinas naturales), la dosis de marcadores inmunológicos, incluyendo citoquinas, factores de crecimiento, así como marcadores inmunológicos de superficie celular y similares. La elevación se mide frente a los niveles en las muestras correspondientes de progenie cuyas madres no fueron expuestas a la composición de la invención (=muestras de control).

Una exposición antigénica que resulta de particular relevancia en el contexto de la invención incluye, aunque sin limitarse a ellas, la exposición a virus, preferentemente rotavirus y adenovirus, o la exposición a bacterias infecciosas, preferentemente *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonellae*, *Clostridia*, *Shigella*, o la exposición a la infección por parásitos infecciosos, preferentemente *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp.* o mezclas de los mismos. Resulta de particular interés para el estado de salud de los bebés, mostrar una mejor capacidad de responder a dicha exposición patógena. Ello puede participar en una mejor protección de la progenie frente a estos patógenos y en definitiva para protegerlos mejor frente a las infecciones correspondientes inducidas por estos patógenos. Más generalmente puede participar en una mejor protección de la progenie frente a muchos

tipos de patógenos (=sistema inmunológico mejorado en general). También pueden encontrarse contemplado dentro del alcance de la presente invención un efecto positivo sobre las alergias, debido a que el efecto sobre el sistema inmunológico puede ser una respuesta más equilibrada y mejor controlada frente a alérgenos.

5 El efecto de refuerzo del sistema inmunológico de la progenie puede alcanzar un máximo durante el periodo de lactancia, o durante la etapa juvenil/infancia. En el ser humano, el máximo refuerzo preferentemente se alcanza entre el nacimiento (día 0) y el mes 24 de vida, más preferentemente entre el nacimiento (día 0) y el día 180 de vida. No se excluye que el efecto de refuerzo pueda durar hasta la etapa de adultez temprana de la vida de la progenie. En el caso de mamíferos no humanos deben considerarse los periodos correspondientes.

10 Ejemplo 1: estudio 1 con ratones

15 Materiales y métodos: se utilizaron ratones BALB/c convencionales hembra de seis semanas de edad (18 a 20 g) en todos los experimentos, obtenidos de Charles River (Domaine des Oncins, BP 010969592, L'Arbresle Cedex, Francia). Los ratones se alojaron bajo condiciones libres de patógenos específicos en las instalaciones para animales de la Clinique Medical Universitaire de Ginebra (CMU-Geneva) y se asignaron 6 a 8 crías de ratón de cada camada a cada grupo de estudio.

20 Los animales disponían de libre acceso a dieta convencional normal. Los ratones gestantes recibieron polvos de probiótico o de placebo suspendidos en el agua de bebida. El agua de bebida se cambió cada día. Se compararon tres grupos:

- Grupo A, control (maltodextrina),
- Grupo B, Lactobacillus paracasei CNCM I-2116 (ST11),
- Grupo C, Lactobacillus rhamnosus CGMCC 1.3724 (LPR).

25 Todos los productos se obtuvieron de una fuente pública común. Los nombres "ST11" y "LPR" son abreviaturas o sobrenombres para los microorganismos citados. La vacuna viva atenuada para el sarampión (MV-S) se obtuvo de Aventis-Pasteur (Lyon, Francia).

30 Mediciones

La determinación de los anticuerpos contra el virus del sarampión (isotipos IgG1 e IgG2a) y de IgG séricas totales se llevó a cabo mediante ELISA en el Centro de Vacunología e Inmunología Neonatal (CVNI) en la University Medical Center de Ginebra (Suiza), según los estándares.

35 Procedimiento experimental (la figura 1 proporciona una vista esquemática del procedimiento):

1. Cuatro ratones gestantes por grupo recibieron agua de bebida que contenía A, B o C durante toda la gestación y durante el destete.
2. En el destete (a las 3 semanas) y posteriormente, todas las crías recibieron agua regularmente sin ningún aditivo. Se sacrificaron las madres.
3. A las 3 semanas (inmunización infantil), se inmunizaron las crías (5 a 8 crías de cada camada; 28 crías de cada grupo) con virus vivo atenuado del sarampión (5×10^5 CCID₅₀).
4. Se realizó un seguimiento semanal de las crías (entre las 3 y 8 semanas de edad) para ganancia de peso y se recogieron heces una vez a la semana (entre las 3 y 8 semanas de edad).
- 45 5. Se extrajeron muestras de sangre de las crías 3 y 5 semanas después de la inmunización para determinar las IgG totales y los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos del sarampión.
6. Cinco semanas después de la inmunización se sacrificaron todos los ratones.

50 Con el fin de evaluar las diferencias con la vacuna del sarampión, se llevaron a cabo pruebas de Kruskal-Wallis seguido de pruebas de Mann-Whitney (Wilcoxon).

55 Resultados: la figura 2 proporciona una ilustración gráfica de los resultados obtenidos. No se identificó ningún efecto sobre el crecimiento del neonato. No se observaron diferencias en las respuestas a la vacuna relacionadas con las camadas, el género o el peso corporal específico. Se observó un incremento significativo en las respuestas de anticuerpos tras la vacunación para el sarampión en todos los grupos, mostrando un proceso normal de maduración de los anticuerpos. La respuesta inmunológica se caracterizaba por respuestas mixtas de Th1:Th2, tal como ilustran los niveles equilibrados de IgG1 e IgG2a observados en todos los grupos. La provisión de un complemento a las madres de ST11 no presentó ningún efecto estadísticamente significativo sobre la sensibilidad de las crías a la vacuna del sarampión (bajo las condiciones experimentales). Sin embargo, la complementación con LPR de las madres gestantes estimuló títulos de IgG más altos que los controles sin alterar el perfil inmunológico general de la respuesta a la vacuna del sarampión.

Conclusión: estos resultados aparentemente indican que los efectos son específicos de la cepa probiótica. En efecto, ST11 aparentemente presenta poco efecto sobre la maduración inmunológica intestinal y respuesta a la vacuna del sarampión de las crías. En contraste, la complementación con LPR de las madres gestantes estimuló respuestas de IgG periféricas incrementadas frente a la vacuna del sarampión en ratones adultos jóvenes.

5

Ejemplo comparativo 2: estudio 2 con ratones

10

Material y métodos: se utilizaron ratones BALB/c hembra de seis semanas de edad convencionales (18 a 20 g) en todos los experimentos, obtenidos de Janvier, Francia. Los ratones se alojaron bajo condiciones libres de patógenos específicos en las instalaciones para animales del Nestlé Research Center y se asignaron 10 a 12 crías de cada camada a cada grupo de estudio.

15

Los animales dispusieron de libre acceso a dieta convencional normal. Los ratones gestantes recibieron polvos de probiótico o de placebo suspendidos en el agua de bebida. El agua de bebida se cambió cada día. Se compararon dos grupos:

- Grupo A, de control (maltodextrina),
- Grupo B, Bifidobacterium lactis CNCM 1-3446 (BL).

20

Todos los productos se obtuvieron de una fuente pública común. El nombre "BL" es una abreviatura para el microorganismo citado. Se adquirió la vacuna del toxoide tetánico, Tetanol Pur (40 UI), de Novartis (Suiza).

Mediciones

25

- La determinación de la proliferación de las células T esplénicas en presencia de anticuerpo anti-CD3 se llevó a cabo según procedimientos estándares. Brevemente, se incubaron esplenocitos con anticuerpos anti-CD3 de ratón unidos a una placa (2,5 µg/ml incubados durante 2 h a 37°C, BD Pharmingen, nº de cat. 553056) en placas de 96 pocillos a 37°C durante 72 h. Se determinó la proliferación celular mediante la incorporación de [metil-³H]timidina (Amersham Pharmacia Biosciences) tal como se ha descrito (DeCicco K.L., Youngdahl J.D. y Ross A.C., Immunology 104:341-348, 2001). Los datos se representan como pulsos por minuto, normalizados respecto al porcentaje de células positivas para CD3 presentes realmente en el bazo de los ratones analizados.

30

35

Las dosificaciones de los anticuerpos IgG séricos específicos para el toxoide tetánico se llevaron a cabo mediante ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con 0,1 µg de antígeno TT completo (Calbiochem, toxoide tetánico de Clostridium tetani, nº d cat. 582231) en PBS. Tras 3 lavados con PBS-Tween-20 al 0,05%, las placas se bloquearon con un tampón de PBS-FCS al 20%-Tween-20 al 0,05% durante 1 h a 37°C y después se lavaron nuevamente 3 veces. Las diluciones en serie de sueros de ratón en tampón de bloqueo se incubaron durante 2 h a 37°C. Tras 3 lavados, se detectaron las IgG específicas de TT mediante la incubación con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con biotina (Southern Biotech, nº de cat. 1034-08) durante 1 h a 37°C. Tras 3 lavados, las placas de ELISA se incubaron con estreptavidina marcada con peroxidasa (KPL, nº de cat. 14-30-00) durante 30 minutos a 37°C. Tras 3 etapas finales de lavado, se añadió sustrato de peroxidasa (KPL, nº de cat. 50-76-00). La reacción colorimétrica se bloqueó con ácido sulfúrico y seguidamente se midió la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro. A continuación se calcularon los títulos de los anticuerpos tal como se ha descrito (Ma Y. y Ross A.C., Proc. Natl. Acad. Sci. 102(38):13556-61, 20 de sept. de 2005).

45

Procedimiento experimental (la figura 3 proporciona una vista esquemática del procedimiento):

50

1. Dos a tres ratones gestantes de cada grupo recibieron agua de bebida que contenía placebo o BL durante toda la gestación y durante las primeras dos semanas de lactancia.
2. En el destete (a las 3 semanas) y posteriormente, todas las crías recibieron agua regularmente sin ningún aditivo. Se sacrificaron las madres.
3. A las 3 semanas, se sacrificó un subgrupo de crías de cada grupo (5 a 6 crías de cada grupo) con el fin de evaluar la proliferación de células esplénicas.
4. A las 3 semanas (inmunización infantil), las crías restantes (5 a 6 crías en cada grupo) se inmunizaron por vía subcutánea con vacuna de TT (1/4 de la dosis para el ser humano).
5. Cuatro semanas después de la primera inmunización se administró un refuerzo de vacuna en las crías.
6. Se extrajeron las crías 4 semanas después de la primera inmunización y 2 semanas después del refuerzo para la determinación de los anticuerpos IgG anti-TT, y después se sacrificaron los ratones.

55

60

Con el fin de evaluar las diferencias en la proliferación de células T y la vacuna de TT se llevaron a cabo pruebas de Mann-Whitney (Wilcoxon).

Resultados: la figura 4 muestra un incremento significativo de las respuestas de anticuerpos tras la vacunación de TT en todos los grupos, mostrando un proceso normal de maduración de los anticuerpos. La provisión de un complemento a las madres de BL durante la gestación y la lactancia estimuló una reactividad sistémica de las células T más alta y títulos de IgG significativamente incrementados en comparación con el placebo.

5 Conclusiones: los dos estudios, Ejemplo 1 y Ejemplo comparativo 2, destacan el hecho de que resulta posible estimular el desarrollo inmunológico en la progenie mediante la intervención perinatal. En particular mediante la complementación de las madres durante la gestación y la lactancia con probióticos. Estos efectos son específicos de cepa, tal como indica el Estudio 1; sin embargo, aparentemente no son específicos de una especie. En efecto, la
10 complementación con LPR o BL de madres gestantes aparentemente estimula una maduración inmunológica más alta en la progenie.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de probióticos en la preparación de una composición para la administración oral en mamíferos hembra gestantes destinada al refuerzo de la inmunidad de su progenie tras el nacimiento, caracterizada porque dichos probióticos son *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724.
2. Utilización según la reivindicación 1 para el refuerzo de las funciones inmunológicas innatas y/o para el estímulo de respuestas inmunológicas específicas frente a antígenos infecciosos de dicha progenie.
- 10 3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición refuerza la transmisión de competencias inmunológicas de dichas hembras a dicha progenie.
- 15 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos mamíferos hembra son seres humanos.
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición se administra por vía oral en dichas hembras, en alimentos, bebidas, complementos alimentarios o composiciones farmacéuticas.
- 20 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición se administra durante un periodo de administración, comprendiendo dicho periodo de administración una parte del periodo de gestación de dichas hembras, en la que dicha parte cubre más de 50% del periodo de gestación.
- 25 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho periodo de administración comprende parte del periodo de lactancia de dicha progenie, en la que dicha parte cubre 30% o más del periodo de lactancia.
- 30 8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho periodo de administración comprende más de 50% del periodo de gestación y 30% o más del periodo de lactancia.
- 35 9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende ingredientes o prebióticos adicionales, preferentemente seleccionados de entre inulina, fructooligosacáridos (FOS), fructooligosacáridos de cadena corta (FOS de cadena corta), galacto-oligosacáridos (GOS), xilo-oligosacáridos (XOS), gangliósidos, goma guar parcialmente hidrolizada, goma acacia, goma de soja, leche complementada con bayas de goji ("*Lactowolfberry*"), extractos de bayas de goji o una mezcla de los mismos.
- 40 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho refuerzo de la inmunidad comprende un incremento de la capacidad de la progenie de responder a una exposición antigénica.
- 45 11. Utilización según la reivindicación 10, en la que dicha respuesta a dicha exposición antigénica comprende:
- una elevación de los anticuerpos específicos para dichos antígenos, preferentemente en el suero de dicha progenie y/o en la saliva y/o en las heces, y/o
- una elevación de los anticuerpos polirreactivos totales, preferentemente en el suero y/o en la saliva y/o en las heces de dicha progenie, y/o
- una elevación de la respuesta inmunológica celular en la sangre de dicha progenie, preferentemente un incremento del número y/o un incremento de la actividad de los leucocitos de dicha progenie.
- 50 12. Utilización según la reivindicación 10 ó 11, en la que dicha exposición antigénica comprende la exposición a virus, preferentemente rotavirus y adenovirus, o la exposición a bacterias infecciosas, preferentemente *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonellae*, *Clostridia*, *Shigella*, o la exposición a la infección por parásitos infecciosos, preferentemente *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium* spp. o mezclas de los mismos.
- 55 13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que dicha capacidad incrementada de responder a dicha exposición antigénica contribuye a la mejor protección de dicha progenie frente a infecciones en la vida temprana, comprendiendo preferentemente dichas infecciones las infecciones víricas, tales como las infecciones por rotavirus y las infecciones por adenovirus, o las infecciones bacterianas, tales como la infección por *Escherichia coli*, la infección por *Vibrio cholerae*, la infección por *Salmonella*, la infección por *Clostridia*, la infección por *Shigella* o las infecciones por parásitos, tales como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium* spp.
- 60 14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho refuerzo de la inmunidad alcanza su máximo durante dicho periodo de lactancia, o durante la etapa juvenil de dicha progenie, preferentemente entre el nacimiento (día 0) y el mes 24 de vida, más preferentemente entre el nacimiento (día 0) y el día 180 de vida.

Figura 1

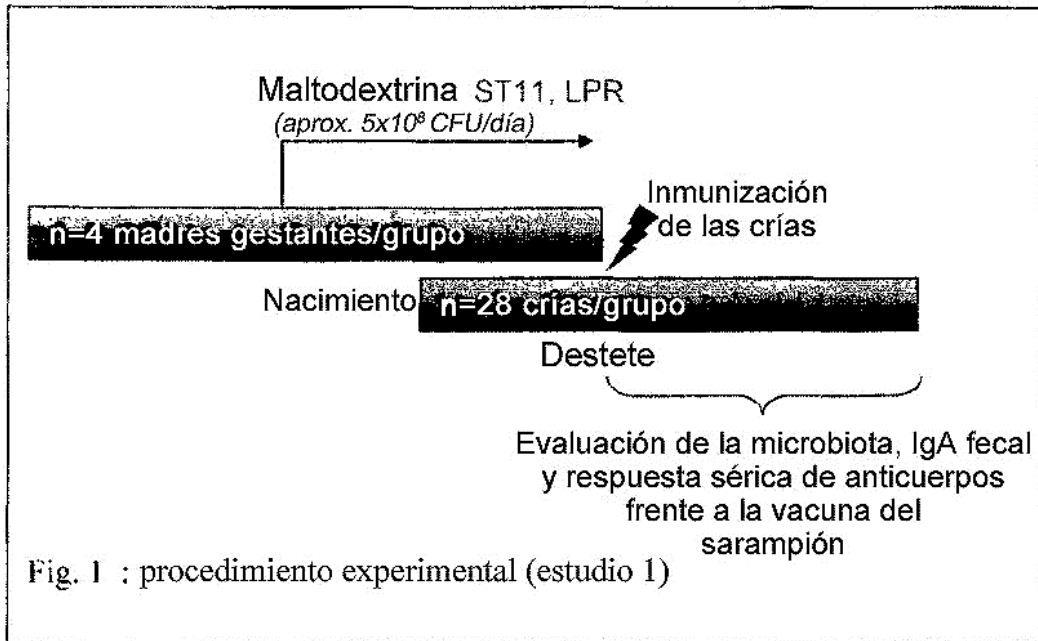


Figura 2

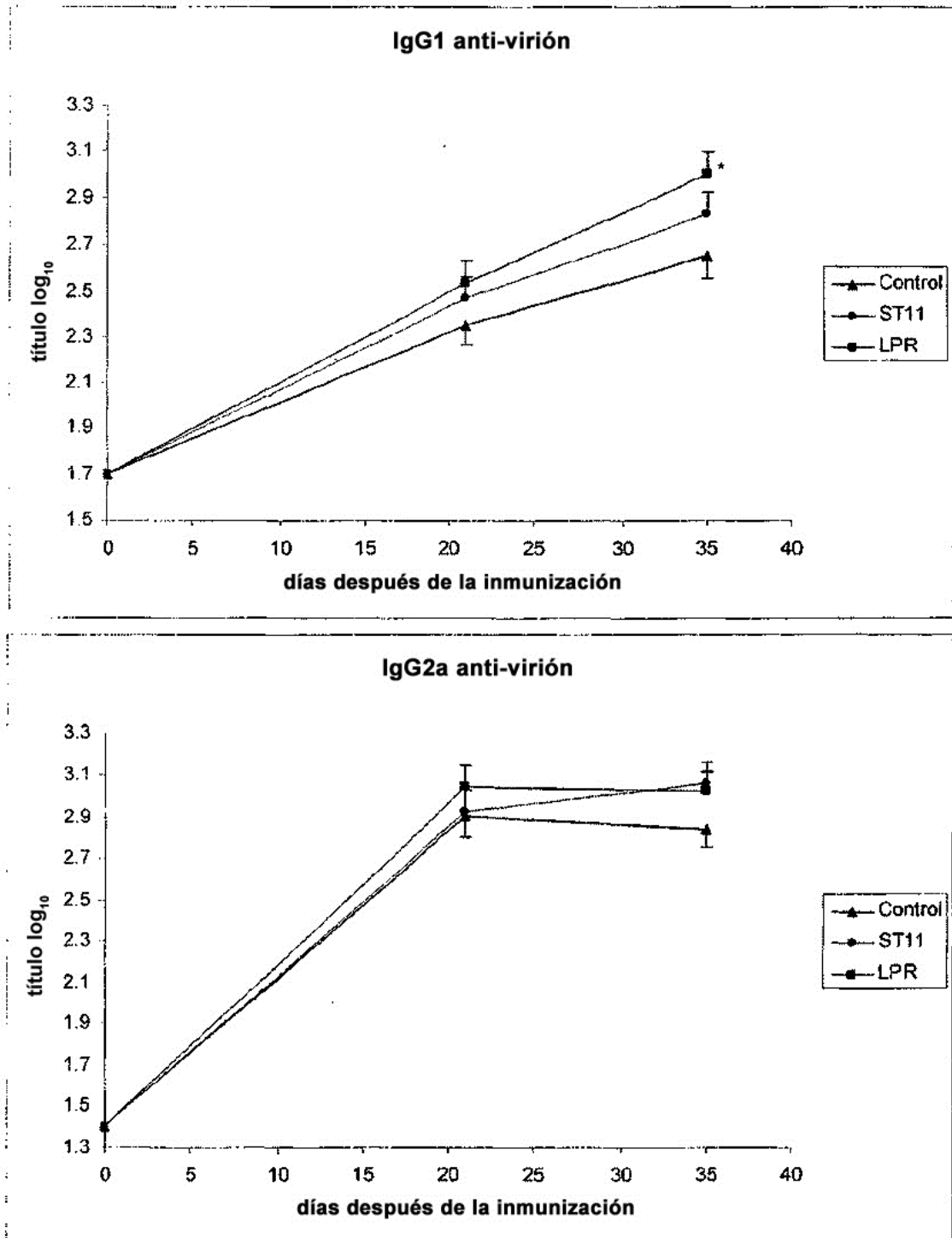


Fig. 2: respuestas de anticuerpos específicos del sarampión. Valores promedio \pm SEM
 *: P=0,03 en comparación con el control.

Figura 3

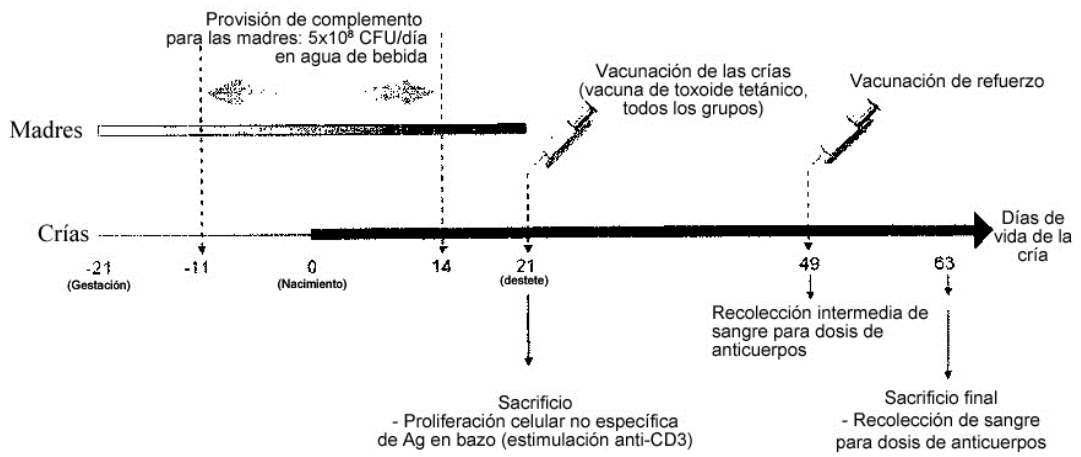


Fig. 3: diseño experimental (estudio 2)

Figura 4

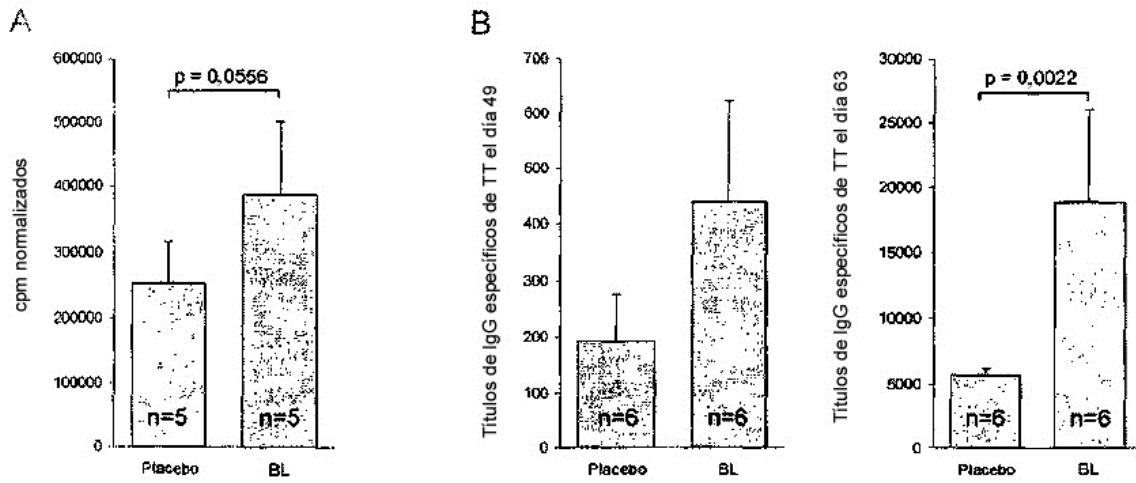


Fig. 4: respuestas inmunológicas sistémicas. (A) Proliferación de células T esplénicas no específicas de antígeno a las 3 semanas. (b) Respuestas de anticuerpos IgG anti-TT 4 semanas después de la primera inmunización (panel izquierdo) y dos semanas después del refuerzo (panel derecho). Los datos son de medianas \pm errores estándar de la mediana. El número de ratones en cada grupo se indica en las columnas.