

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 572**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009** **E 09769150 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013** **EP 2318046**

54 Título: **Probióticos, IgA secretorio e inflamación**

30 Prioridad:

24.06.2008 EP 08158827

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BENYACOUB, JALIL;
CORTHESY, BLAISE;
BLUM-SPERISEN, STÉPHANIE y
FAVRE, LAURENT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 447 572 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

Probióticos, IgA secretorio e inflamación

5 La presente invención se refiere de manera general al sector de la nutrición, salud y bienestar. En particular, la presente invención se refiere a probióticos y a formas de aumentar su efectividad, y también a una combinación de probióticos con IgA secretorios y posibles utilizaciones de esta combinación.

10 La inflamación es la respuesta biológica compleja de tejidos a estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas o irritantes. En general, es un intento de protección por el organismo para eliminar los estímulos dañinos, así como para iniciar el proceso de curación para los tejidos. No obstante, una inflamación regulada de forma no apropiada puede conducir a varias enfermedades, con independencia de la edad del paciente.

15 El envejecimiento está asociado frecuentemente a una desregulación del sistema inmune, tal como una disminución observada de la respuesta inmune mediada por células juntamente con una disfunción humoral inmune incrementada (por ejemplo, menor respuesta a las vacunas). El envejecimiento está asociado además frecuentemente con un grado de inflamación de baja intensidad. Como consecuencia, en particular muchas personas mayores se encuentran sometidas a un mayor riesgo de enfermedades infecciosas y no infecciosas que contribuyen a la morbilidad y a la mortalidad.

20 La inflamación no deseada puede ser tratada por medicación apropiada. No obstante, la medicación puede tener como resultado, en todos los casos, efectos secundarios no deseados y frecuentemente requiere la supervisión de personal médico. Como consecuencia, existe la necesidad en este sector de disponer de composiciones que puedan ser administradas preferentemente de manera diaria, sin efectos secundarios no deseados y sin necesidad de consultar a un médico y que puedan ser utilizadas para el tratamiento o prevención de la inflamación.

Una forma de conseguir este objetivo consiste en administrar una composición alimenticia que comprenda probióticos.

30 Los microorganismos probióticos se sabe que tienen un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del huésped. En las últimas décadas, la utilización de bacterias probióticas ha recibido una considerable atención como forma segura y accesible de tratamiento, por ejemplo, para enfermedades gastrointestinales (Isolauri E, y otros, Dig Dis Sci 1994,39:2595-2600). Las bacterias probióticas típicas que se han utilizado a este respecto pertenecen a los géneros de lactobacillus o bifidobacterias.

35 La efectividad de los probióticos depende, en parte, de su capacidad de resistir las condiciones existentes en el tubo digestivo y en adherirse al epitelio intestinal. Además, un aspecto crítico que condiciona sus beneficios potenciales con respecto al huésped es la interacción ("cross-talk") del probiótico con el entorno del huésped y su impacto en la barrera del epitelio y su función.

40 Si bien algunos probióticos consiguen ya resultados muy respetables en términos de colonización del tubo gastrointestinal y de interacción con el huésped, sería deseable tener a disposición una herramienta para mejorar adicionalmente la efectividad con la que los microorganismos probióticos colonizan el intestino e interaccionan con el huésped.

45 Como consecuencia, el objetivo de la presente invención ha sido el de facilitar al sector una composición que tiene las mismas ventajas que la administración de probióticos a una persona que los necesite pero que es incluso más efectivo, en el tratamiento o prevención de la inflamación que la administración de probióticos solos.

50 El documento WO97/20577 da a conocer un procedimiento de tratamiento o profilaxis de enfermedades en animales, cuyo procedimiento comprende la administración de cantidades efectivas de anticuerpos sustancialmente completos y una o varias cepas de organismos probióticos adecuados. Los autores de WO97/20577 describen que la administración de anticuerpos en forma sustancialmente completa junto con un organismo probiótico proporciona altos niveles de protección contra enfermedades gastrointestinales. Esto se considera sorprendente dado que anteriormente se había aceptado que era necesario someter los anticuerpos a digestión proteolítica a efectos de obtener profilaxis o tratamiento eficientes de una enfermedad.

60 Pant Neha y otros han informado en BMC Microbiology, 2007, Biomed Central, London GB, vol. 7, 27, la combinación de probióticos con anticuerpos anti-rotavirus en un modelo de diarrea rotavírica de ratón. Los anticuerpos son inmunoglobulinas derivadas de calostro bovino específico que se asocian a rotavirus.

Los presentes inventores se han propuesto solucionar esta necesidad y han descubierto que podían conseguir este objetivo mediante la utilización de acuerdo con la reivindicación 1 y una composición alimenticia de acuerdo con la reivindicación 12.

65 La presente invención se refiere, por lo tanto, a una composición a utilizar de acuerdo con la reivindicación 1.

Sin desear quedar limitados por ninguna teoría, los inventores creen que SIgA y los probióticos pueden formar combinaciones que pueden potenciar la interacción de probióticos con el huésped y mejorar su estado de salud.

5 El mecanismo de interacción que se ha sugerido de la combinación inmune con la mucosa intestinal del huésped, se indica en la figura 1.

10 La primera interacción de probióticos con el huésped tiene lugar a nivel de la mucosa intestinal. Entre los criterios principales para la selección de un microorganismo probiótico se encuentra su capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.

Esta adherencia parece ser necesaria para bloquear la entrada de patógenos y contribuir a modular, por ejemplo, las funciones protectoras inmunes.

15 Una de las propiedades más características del sistema inmune de la mucosa en la mayor parte de mamíferos es la presencia predominante de anticuerpos secretorios, en particular, IgA (SIgA) secretorio, una clase de anticuerpos exclusiva de las mucosas.

20 La biosíntesis de IgA polímero tiene lugar en la lámina propia de la mucosa, y su transporte a través del epitelio que recubre las superficies de la mucosa está asegurada por el receptor Ig polímero (plgR) expresado por células foliculares y columnares del epitelio.

25 En las secreciones, una parte significativa del plgR designada componente secretorio (SC) permanece asociado con IgA polímero, liberando SIgA.

La liberación de SIgA al lumen depende de la producción de SC, cuya expresión es regulada de modo ascendente después del nacimiento. El plgR se muestra crítico para la estabilidad y el anclaje del anticuerpo en la mucosa (Phalipon y otros (2002) Secretory component: A new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. Immunity 17:107-115).

30 Los neonatos en los que los anticuerpos SIgA son escasamente detectables, dependen de IgG materno transferido a través de la placenta y de un suministro exógeno de SIgA que se encuentra abundantemente en la leche materna.

35 Conjuntamente, esto confiere inmunización pasiva en el intestino que es esencial para la producción del huésped durante la fase de conformación y maduración del sistema inmune gastrointestinal.

40 Por lo tanto, la composición de la presente invención será especialmente beneficiosa para recién nacidos y bebés (hasta 2 años de edad), puesto que no producen SIgA en cantidades suficientes, sino que confían en un suministro externo.

Los inventores creen en la actualidad que es esta asociación de SIgA con probióticos la que potencia la interacción de probióticos con el huésped, de manera que se mejoran los beneficios de salud para el huésped.

45 Los presentes inventores han identificado que una combinación del anticuerpo SIgA con probióticos es capaz de mejorar la interacción de las bacterias con una línea celular humana, sirviendo como un mimico del epitelio gastrointestinal.

50 Los presentes inventores han utilizado in vitro, monocapas de células epiteliales Caco-2 para examinar la forma en que SIgA favorece la interacción entre bacterias no patógenas y la superficie del epitelio. Dos cepas probióticas representativas de los dos géneros principales lactobacillus y bifidobacterias fueron evaluadas como prueba de principio, es decir, Lactobacillus rhamnosus NCC4007 (LPR) y Bifidobacterium lactis NCC2818 (BL818).

55 Se descubrió que SIgA y/o SC, cuando se asocian con probióticos, promueven la interacción de probióticos con el huésped y modulan procesos subsiguientes involucrados en mecanismos de defensa.

60 Esto contribuye a aumentar los beneficios sanitarios de los probióticos. Por su combinación con probióticos, SIgA y/o SC podrían ayudar de manera óptima a poner en marcha reacciones eficientes de protección y defensa del huésped, incluyendo respuestas inmunes contra varios patógenos. Dado su efecto homeostático (Corthesy B. (2007), J. Immunol.;178: 27-32), SIgA combinado con probióticos, ayudará a generar un efecto de incremento inmune, impidiendo simultáneamente cualquier proceso inflamatorio perjudicial.

Como consecuencia, una realización de la presente invención es una composición alimenticia de acuerdo con la reivindicación 12.

65 También se describe la utilización de una composición que comprende SIgA y, como mínimo, un probiótico para la preparación de un producto para el tratamiento o prevención de la inflamación.

También se describe una composición que comprende SIgA y, como mínimo, un probiótico para su utilización en el tratamiento y/o prevención de la inflamación.

El tratamiento de la inflamación comprende la reducción de la inflamación.

El término "probiótico" significa preparado de células microbianas o de componentes de células microbianas con efecto beneficioso para la salud o bienestar del huésped. (Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. y otros "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999;10 107-10).

Los microorganismos microbióticos que se describen en esta descripción, son seleccionados del grupo que consiste en Bifidobacterias, Lactobacillus, Streptococos y Sacaromices o mezclas de los mismos, seleccionadas en particular del grupo que consiste en Bifidobacterium longum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus salivarius, Enterococcus faecium, Saccharomyces boulardii y Lactobacillus reuteri o mezclas de los mismos, preferentemente del grupo que consiste en Lactobacillus johnsonii (NCC533; CNCM I-1225), Bifidobacterium longum (NCC490; CNCM I-2170), Bifidobacterium longum (NCC2705; CNCM I-2618), Bifidobacterium lactis (2818; CNCM I-3446), Lactobacillus paracasei (NCC2461; CNCM I-2116), Lactobacillus hamnosus GG (ATCC53103), Lactobacillus rhamnosus (NCC4007; CGMCC 1.3724), Enterococcus faecium SF 68 (NCIMB10415), y mezclas de los mismos.

La composición a utilizar de acuerdo con la presente invención o la composición alimenticia de acuerdo con la presente invención puede contener también prebióticos. La añadidura de prebióticos es beneficiosa puesto que, combinada con probióticos, puede facilitar efectos sinérgicos en términos de ventajas sanitarias. Una composición que comprende una combinación de prebióticos y probióticos es conocida habitualmente como composición simbiótica.

"Prebiótico" significa sustancias alimenticias que promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas tales como bifidobacterias o lactobacilos y/o probióticos en el intestino. No son descompuestos en el estómago o absorbidos en el tubo GI de la persona que los ingiere, sino que son fermentados por la microflora gastrointestinal y/o por probióticos.

Los prebióticos que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención no están especialmente limitados e incluyen todas las sustancias alimenticias que favorecen el crecimiento de probióticos en el intestino. Preferentemente, pueden ser seleccionados del grupo que consiste en oligosacáridos, que contienen opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; fibras de dieta, en particular fibras solubles, fibras de soja; inulina; o mezclas de los mismos. Son prebióticos preferentes los fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos de soja, glicosil de sacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), oligosacáridos de palatinosa (PAO), malto-oligosacáridos, pectinas y/o hidrolizados de los mismos.

Se incluyen entre los estados inflamatorios típicos que pueden ser tratados o prevenidos por la utilización de la presente invención, sin que ello sea limitativo, inflamaciones agudas tales como sepsis, infecciones, quemaduras, e inflamaciones crónicas tales como enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerante, enterocolitis necrotizante, inflamación de la piel, tal como inflamación de la piel inducida por UV o de forma química, eczema, piel reactiva, soriasis, vitiligo, acné, inflamación del hígado, cirrosis alcohólica, alergia, atopía, inflamación de huesos, artritis reumatoide, lupus sistémico, síndrome de Gougerot-Sjögren, síndrome de Reiter, poliometilitis, dermatomiositis, tiroiditis, diabetes tipo I, enfermedad de Addison, hepatitis auto-inmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Biermer, esclerosis múltiple, miastenia, encefalomielitis, inflamación de los ojos, inflamación asociada a obesidad, inflamación de baja intensidad relacionada con la edad, síndrome de Blau, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, síndrome metabólico, gingivitis, parodontitis y combinaciones de las mismas.

La composición a utilizar de acuerdo con la presente invención puede ser utilizada también para controlar y/o aliviar reacciones inflamatorias del cuerpo.

La composición a utilizar, de acuerdo con la presente invención, puede ser utilizada, además, para generar, mejorar o reforzar la homeostasis y la tolerancia oral.

El producto preparado puede ser un producto alimenticio, un producto alimenticio para animales, o una composición farmacéutica. Por ejemplo, el producto puede ser una composición nutricional, un nutracéutico, una bebida, un aditivo alimenticio, o un medicamento.

Un aditivo alimenticio o un medicamento puede adoptar la forma de tabletas, cápsulas, pastillas, o un líquido, por ejemplo. Los aditivos alimenticios o medicamentos son proporcionados preferentemente como formulaciones de liberación sostenida, permitiendo un suministro constante de SIgA y de probióticos durante un tiempo prolongado.

El producto es seleccionado, preferentemente, del grupo que consiste en productos basados en leche en polvo; bebidas instantáneas; formulaciones listas para beber, productos nutricionales en polvo, líquidos nutricionales,

productos basados en la leche, en particular yogurts o helados; productos de cereales, bebidas, agua, café, capuchino, bebidas de malta, bebidas con sabor de chocolate, productos culinarios, sopas, tabletas y/o jarabes.

La leche puede ser cualquier leche que se pueda obtener de animales o plantas y es preferentemente leche de vaca, leche humana, leche de oveja, leche de cabra, leche de caballo, leche de camello, leche de arroz o leche de soja.

En vez de leche, también se pueden utilizar fracciones de proteínas derivadas de la leche o calostro.

La composición puede contener además hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglomerantes, agentes formadores de película, agentes de encapsulado/materiales de encapsulado, materiales de pared/envolvente, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensoactivos, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, portadores, cargas, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, agentes de ayuda para los procesos (disolventes), agentes fluidificantes, agentes de enmascarado de sabor, agentes de carga, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes, y antimicrobianos. También pueden contener aditivos farmacéuticos convencionales y coadyuvantes, excipientes y diluyentes incluyendo, sin que ello sea limitativo, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, lignin sulfonato, talco, azúcares, almidón, goma arábica, aceites vegetales, polialquilen glicoles, agentes de sabor, conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, agentes de carga, y similares. Además, pueden contener un material portador orgánico o inorgánico adecuado para administración oral o entérica, así como vitaminas, elementos de traza de minerales, y otros micronutrientes, de acuerdo con las recomendaciones de organismos estatales tales como USRDA.

La composición a utilizar de acuerdo con la presente invención puede comprender una fuente de proteínas, una fuente de carbohidratos y/o una fuente de lípidos.

Se puede utilizar cualquier proteína de dieta adecuada, por ejemplo, proteínas animales (tales como proteínas de la leche, proteínas de la carne, y proteína de huevos); proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisantes); mezclas de aminoácidos libres o combinaciones de los mismos. Son especialmente preferentes las proteínas de la leche tales como caseína y suero, y proteínas de la soja.

Si la composición comprende una fuente de grasas, la fuente de grasas proporciona más preferentemente de 5% a 40% de la energía de la fórmula; por ejemplo, 20% a 30% de la energía. Se puede añadir DHA. Se puede obtener un perfil adecuado de grasas utilizando una mezcla de aceite de canola, aceite de maíz, y aceite de girasol altamente oleico.

Una fuente de carbohidratos puede proporcionar más preferentemente, entre 40% y 80% de la energía de la composición. Se puede utilizar cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, malto-dextrinas y mezclas de los mismos.

El producto preparado por la presente invención que se puede administrar a humanos o a animales, en particular animales de compañía, domésticos, o ganado. Tiene efectos beneficiosos para cualquier grupo de edad. Preferentemente, el producto está destinado a bebés, jóvenes, adultos, o personas mayores. No obstante, puede ser administrado a madres durante el embarazo y lactancia para el tratamiento del niño.

La composición de la presente invención será efectiva siempre que se administren simultáneamente probióticos y SIgA, con poca diferencia de tiempo, uno después del otro, por ejemplo, dentro de un marco de tiempo máximo de menos de 60 minutos, preferentemente menos de 30 minutos, de modo más preferente, menos de 15 minutos, y de modo más preferente menos de 5 minutos, y/o se combinan antes de la administración estando presentes en el producto alimenticio.

No obstante, se ha descubierto que la combinación de probióticos y SIgA es particularmente efectiva si el SIgA y probióticos se combinan en complejos antes de la administración. Esto tiene la ventaja de que los complejos beneficiosos no necesitan formarse después del consumo del producto, sino que ya se encuentran presentes en el producto alimenticio.

Como consecuencia, una realización se refiere a la utilización de una composición que comprende SIgA y probióticos, en la que SIgA y, como mínimo, un probiótico están, como mínimo parcialmente, asociados en la composición.

El SIgA y, como mínimo, un probiótico, se encuentran preferentemente presentes en forma de complejos inmunes, por ejemplo, de forma que, como mínimo 90%, más preferentemente, como mínimo 95%, de manera más preferente todas las bacterias probióticas, se encuentren presentes en forma de complejo inmune en asociación con, como mínimo, una molécula de SIgA, por ejemplo, un mínimo de 5 moléculas de SIgA.

La composición puede comprender también, como mínimo, otro tipo de otra bacteria de calidad alimenticia, preferente seleccionada del grupo que consiste en bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, enterococos, o mezclas de las mismas. Estas otras bacterias de calidad alimenticia pueden contribuir a obtener una microflora sana del intestino y, por lo tanto, contribuirán a conseguir el objetivo de la presente invención de manera todavía más efectiva.

También se describe una composición alimenticia que comprende SIgA y, como mínimo, un microorganismo probiótico. El SIgA y el microorganismo probiótico pueden estar combinados preferentemente en la composición alimenticia. El SIgA y el microorganismo probiótico pueden encontrarse presentes preferentemente en una relación estequiométrica de, como mínimo 10:1, preferentemente, como mínimo 100:1, más preferentemente, como mínimo, 2000:1 a 100000:1. Evidentemente, cuantas más moléculas de SIgA estén fijadas a la superficie del microorganismo probiótico, más efectiva será esta combinación. El límite superior de saturación de SIgA está determinado por la superficie de los microorganismos probióticos y por el número de sitios de unión disponibles para el SIgA.

De manera típica, los probióticos pueden ser efectivos en un amplio rango de cantidad. En general, es preferible que el producto comprenda entre 10^2 y 10^{10} células de probióticos por dosis diaria.

La cantidad de SIgA requerida para conseguir un efecto, tampoco está limitada. Es preferible, en general, que el producto comprenda entre 0,0001 mg de SIgA y 100 mg de SIgA por dosis diaria.

Los técnicos en la materia comprenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención que se indican en esta descripción, sin salir del ámbito de la invención, tal como se da a conocer. En particular, las características descritas para los usos de la presente invención se pueden aplicar a la composición, por ejemplo, composición alimenticia de la presente invención, y viceversa.

Otras ventajas y propiedades de la presente invención quedarán evidentes en los siguientes ejemplos y figuras.

La figura 1 muestra esquemáticamente la forma en la que se cree que el SIgA mejora los efectos de bacterias comensales, cuando está asociado con ellas al incrementar la interacción con la mucosa intestinal del huésped. Se han mostrado rutas posibles y documentadas de interacción de SIgA asociado con bacterias comensales con la mucosa intestinal del huésped.

La figura 2 muestra el resultado de experimentos de comprobación de las propiedades de unión de las dos cepas probióticas, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818), representativas de los dos géneros principales de Lactobacilos y Bifidobacterias a células epiteliales. Los datos se expresan como UFC medias por 100 células Caco-2 $\pm$ SEM.

La figura 3 muestra el resultado de experimentos de comprobación de las propiedades de unión de las dos cepas probióticas, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818), representativas de los dos géneros principales de Lactobacilos y Bifidobacterias a células epiteliales y la influencia de IgA secretorio (SIgA) o componente secretorio (SC). Los datos se expresan como UFC medias por 100 células Caco-2 $\pm$ SEM.

La figura 4 muestra los resultados de experimentos de comprobación del efecto de dos cepas probióticas, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818), representativas de los dos géneros principales de Lactobacilos y Bifidobacterias, solos o en combinación con SIgA o SC, sobre la resistencia eléctrica transepitelial (TER) que mide la permeabilidad epitelial. Los datos se expresan como ohmios medios por $\text{cm}^2 \pm$ SEM.

La figura 5 muestra el resultado de experimentos de comprobación del efecto de LPR, combinado o no con SIgA o SC, sobre activación NF- κ B en una monocapa de células Caco-2. La disminución en la actividad de unión de NF- κ B es indicativa de ruta o rutas inflamatorias atenuadas dentro de la célula Caco-2.

La figura 6 muestra el resultado de experimentos de comprobación del efecto de LPR, combinado o no, con SIgA o SC, sobre invasión de *S. flexneri* de células Caco-2. Se utilizaron dos células SIgA monoclonales: una SIgA no específica (SIgA no específica) que reconoce un epítipo de *Salmonella*, y una anti- *S. flexneri* específica de SIgA (SIgAC5). Los datos se expresan como UFC medias por filtro Transwell $\pm$ SEM.

La figura 7 muestra el resultado de experimentos de comprobación del efecto probióticos sobre la expresión del receptor Ig polímero (pIgR) en una monocapa de Caco-2. (A) Se comprobaron diferentes tratamientos después de 16 horas, incluyendo una combinación de probióticos con SIgA no específico y combinación de *S. flexneri* con SIgA específico anti-*S. flexneri* (transferencia Western). (B) El análisis semi-cuantitativo de niveles de expresión de pIgR normalizados a β -actina por análisis densitométrico de las bandas identificadas en los geles de A. (C) Cinética de la expresión de pIgR a lo largo de 24 horas de incubación de células Caco-2 con diferentes preparaciones (ELISA).

Ejemplo 1:

• UNIÓN A CÉLULAS EPITELIALES

Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por 1 cm^2 de filtro Transwell. Las células fueron incubadas durante 16 horas a 37°C con diferentes dosis de bacterias, indicadas en las leyendas de la figura, en ausencia de antibióticos o FCS. Se utilizaron cultivos recientes después de una noche de bacterias LPR, BL818 y E. coli TG-1. Las células fueron lavadas a continuación antes de enumeración. Las bacterias unidas se contaron en placas sobre placas de MRS o LB. Para cada experimento se llevaron a cabo pruebas triplicadas. Los datos fueron expresados como medias de bacterias unidas por 100 células Caco-2 $\pm$ SEM. Se llevaron a cabo pruebas triplicadas para cada experimento. En un experimento posterior, se incubaron células con 2×10^7 de bacterias durante 16 horas a 37°C , en presencia de dosis crecientes de SIgA o SC, tal como se ha indicado en la leyenda de la figura 3. Las células fueron lavadas a continuación antes de enumeración. Las bacterias unidas fueron contadas por cultivo en placa, sobre placas MRS o LB. Para cada experimento, se llevaron a cabo pruebas triplicadas. Los datos se expresaron como medias de las bacterias unidas por 100 células Caco-2 $\pm$ SEM. Se llevaron a cabo pruebas triplicadas para cada experimento.

Se observa una unión preferente a células Caco-2 polarizadas de LPR y BL818 en comparación con E. coli TG-1 (figura 2). Existe una capacidad de unión dependiente de la dosis de probióticos con respecto a células epiteliales intestinales. Se puede observar que las propiedades de unión podrían ser diferenciadas entre las dos cepas.

Para experimentos posteriores, se utilizaron 2×10^7 UFC de probióticos, dado que esta cantidad no condujo a cambio alguno de pH en el medio, por una parte, y mostró una proporción de unión eficiente por otra parte.

El incremento de la dosis de SIgA monoclonal potenció la capacidad de LPR y de BL818 de unirse a monocapas de células Caco-2 polarizadas. Los componentes secretorios, por su parte, no mostraron estas propiedades (figura 3). La dosis de $1 \mu\text{g}$ de SIgA que confiere una mejora significativa en la capacidad de unión del probiótico, se seleccionó para experimentos posteriores. Esta dosis posibilita un complejo final constituido por 50.000 a 100.000 unidades de SIgA para 1 bacteria.

Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3.

Ejemplo 2:

• FUNCIÓN BARRERA EN MONOCAPA DE CÉLULAS CACO-2 POLARIZADAS

Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por 1 cm^2 de filtro Transwell. Las células fueron incubadas durante 24 horas a 37°C con 2×10^7 UFC de bacterias en ausencia de antibiótico o FCS. Las bacterias fueron comprobadas solas o en combinación con SIgA o SC a las concentraciones indicadas en la leyenda de la figura 4. Se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TER) a 3, 6, 9, 15 y 24 horas. Los controles incluyen incubación con SIgA y SC solo. Se llevaron a cabo pruebas triplicadas para cada experimento.

Un incremento de 20-25% en resistencia eléctrica transepitelial (TER) resultó de la incubación de una monocapa de células Caco-2 polarizada con LPR o BL818 solo, sugiriendo que los probióticos potenciaban la función de barrera epitelial. Esto siguió siendo cierto cuando las bacterias fueron combinadas con SIgA o SC (figura 4). SIgA o SC, por sí mismas, no condujeron a ningún cambio de la TER.

Los resultados se muestran en la figura 4.

Ejemplo 3:

• ACTIVACIÓN NF- κ B EN MONOCAPA DE CÉLULAS CACO-2 POLARIZADAS

Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por 1 cm^2 de filtro Transwell. Las células fueron incubadas durante 16 horas a 37°C con 2×10^7 UFC de LPR in en ausencia de antibiótico o FCS. Las bacterias fueron comprobadas solas o en combinación con SIgA o SC a las concentraciones indicadas en la leyenda de la figura 5. Se utilizaron S. flexneri, S. typhi y H. pylori (2×10^7 UFC) como controles patogénicos. Se prepararon extractos nucleares y citoplásmicos y se realizaron por ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) y transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal anti-I κ B α -específico. Se llevaron a cabo pruebas triplicadas para cada experimento.

La exposición a bacterias patógenas condujo a una activación mucho más pronunciada de NF- κ B nuclear en comparación con bacterias no patógenas (figura 5).

La desaparición de I κ B α (panel inferior) refleja la activación de la ruta que conduce a la translocación nuclear de NF- κ B. A este respecto, si bien LPR solo tiene efecto suave sobre la activación de NF- κ B, la activación de LPR con SIgA o SC reduce la activación de NF- κ B en células Caco-2 (no se comprobó BL818). La incubación de células epiteliales con S. flexneri patógeno condujo a la desaparición total de expresión de I κ B α .

Se muestran resultados en la figura 5.

Ejemplo 4:

• ACTIVIDAD ANTI-PATÓGENA

- 5 Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por 1 cm^2 de filtro Transwell. Las células fueron incubadas durante 16 horas a 37°C con 2×10^7 UFC de LPR en ausencia de antibiótico o FCS. Se comprobó LPR solo o en combinación con $0,2\text{ }\mu\text{g}$ de SC, $1\text{ }\mu\text{g}$ de SIgA policlonal o $1\text{ }\mu\text{g}$ de LPS SIgAC5 anti-S. flexneri específico. Después de incubación con LPR, las células fueron lavadas y a continuación incubadas con 10^7 S. flexneri durante 6 horas, se lavaron nuevamente y se incubaron con 50 mg/ml de gentamicina durante 45 min. Finalmente, las células fueron sometidas a lisis y se enumeraron S. flexneri intracelulares sobre placas de agar LB. Se llevaron a cabo pruebas triplicadas para cada experimento. La adición de LPR redujo la infección de la monocapa de células Caco-2 polarizadas por S. flexneri de manera dependiente de la dosis. El efecto fue altamente incrementado por la combinación con SIgA. La prevención completa de infección fue conseguida cuando se utilizó anticuerpo SIgAC5-específico de LPS de S. flexneri (figura 6).
- 15 Los resultados se han mostrado en la figura 6.

Ejemplo 5:

• EXPRESIÓN DE RECEPTOR IG POLÍMERO EN MONOCAPA DE CÉLULAS CACO-2 POLARIZADA

- 20 Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por 1 cm^2 de filtro Transwell. Las células fueron incubadas durante 16 horas a 37°C con 2×10^7 UFC de LPR en ausencia de antibiótico o FCS. Los probióticos fueron comprobados solos o en combinación con $0,2\text{ }\mu\text{g}$ de SC, $1\text{ }\mu\text{g}$ de SIgA policlonal. S. flexneri de control fue comprobado solo o en combinación con $1\text{ }\mu\text{g}$ de SIgAc5-LPS anti-S. flexneri. Después del lavado, se recuperaron directamente células de Caco-2 de los filtros Transwell y se sometieron a lisis. Se retiraron los núcleos y residuos celulares, así como los citoplasmas fueron analizados por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-plgR y anti-sueros de SC humano y β -actina como controles. Se llevaron a cabo pruebas triplicadas para cada experimento.
- 25 En un siguiente experimento, se incubaron células siguiendo el mismo procedimiento, y a continuación se recuperaron del filtro Transwell a las 8, 16 y 24h de incubación. Se llevó a cabo análisis cuantitativo de plgR por análisis ELISA sobre fracciones de residuos celulares/citoplasma. Las proteínas totales fueron determinadas por ensayo de proteínas BCA. Los valores fueron normalizados al contenido de proteínas y los datos se expresaron como medias de ng plgR/mg de proteína total $\pm$ SEM.
- 30 La expresión de plgR en células epiteliales fue normalizada a la expresión de β - actina. Tal como se manifestó por transferencia Western (panel inferior) y análisis densitométrico de las bandas respectivas (panel inferior) hubo un incremento del nivel de plgR después de exposición durante una noche de monocapas de Caco-2 polarizadas a combinaciones de LPR o BL818 con SIgA o SC en comparación con probióticos solos (figura 7a). SIgAC5- LPS anti-S. flexneri específico impidió la interacción del patógeno con la monocapa polarizada de células Caco-2, explicando ello la disminución de expresión plgR en comparación con el tratamiento de S. flexneri solo.
- 35 Los resultados mostraron además un incremento dependiente del tiempo del nivel de receptor Ig polímero (plgR) después de exposición de monocapas de células Caco-2 polarizadas a combinaciones probióticas con SIgA o SC (figura 7b).
- 40 Los resultados se han mostrado en la figura 7.
- 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para su utilización en el tratamiento, reducción o prevención de inflamación, comprendiendo la composición SIgA y como mínimo un probiótico, en la que el probiótico es seleccionado del grupo que consiste en *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.
- 10 2. Composición para su utilización, de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que se genera, mejora o refuerza homeostasis y tolerancia oral.
- 15 3. Composición para su utilización, de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el probiótico es seleccionado entre el grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, y *Lactobacillus reuteri* y mezclas de los mismos, preferentemente es seleccionado del grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* (NCC533; CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (NCC490; CNCM I-2170), *Bifidobacterium longum* (NCC2705; CNCM 1-2618), *Bifidobacterium lactis* (2818; CNCM 1-3446), *Lactobacillus paracasei* (NCC2461; CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007; CGMCC 1.3724), y mezclas de los mismos.
- 20 4. Composición para su utilización, de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el producto es un producto alimenticio, un producto alimenticio para animales o una composición farmacéutica.
- 25 5. Composición para su utilización, de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el producto está destinado a consumo por humanos, en particular niños, jóvenes, adultos o personas mayores.
- 30 6. Composición para su utilización, de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el SIgA y el, como mínimo, un probiótico, están asociados, por lo menos parcialmente, en la composición.
- 35 7. Composición para su utilización, de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, para aliviar reacción inflamatoria.
- 40 8. Composición para su utilización, de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende, como mínimo, otro tipo de bacterias de grado alimentario, seleccionada preferentemente entre el grupo que consiste en bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, enterococos o mezclas de los mismos.
- 45 9. Composición para su utilización, de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el producto contiene además, como mínimo, un prebiótico, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en oligosacáridos.
- 50 10. Composición para su utilización, de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el producto comprende entre 10^2 y 10^{10} células de probióticos por dosis diaria.
11. Composición para su utilización, de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el producto comprende entre 0,0001 mg SIgA y 10mg de SIgA por dosis diaria.
12. Composición alimenticia que comprende SIgA y como mínimo un microorganismo probiótico, en el que como mínimo, un microorganismo probiótico y el SIgA se encuentran presentes en forma de un complejo inmune, y en el que el probiótico es seleccionado del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus reuteri* o mezclas de los mismos.

Figura 1:

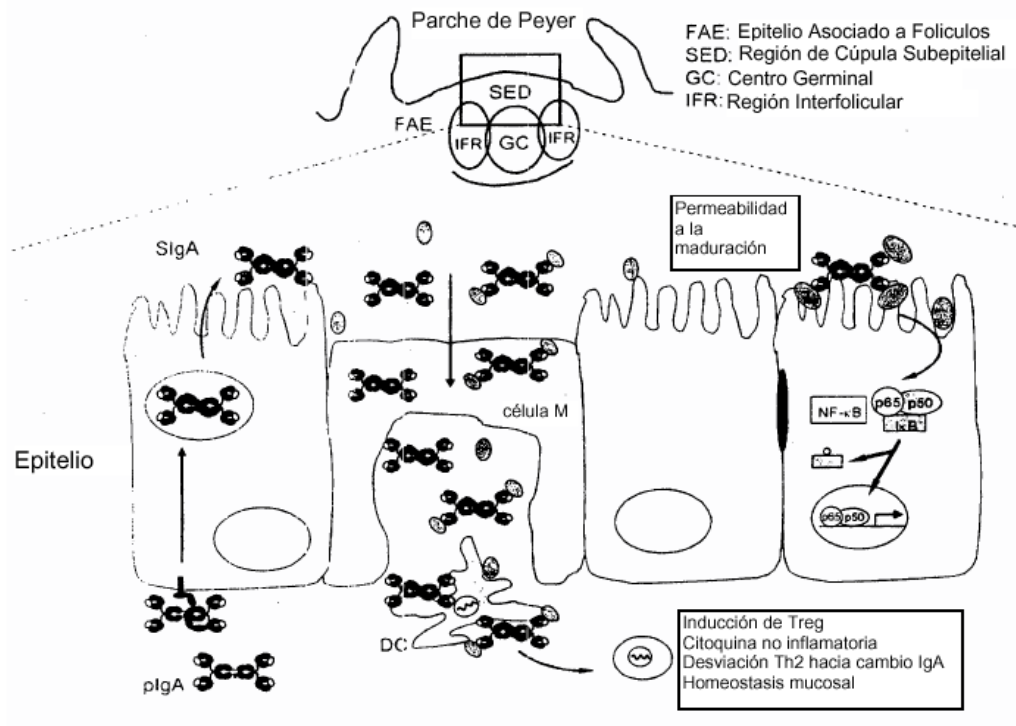


Figura 2:

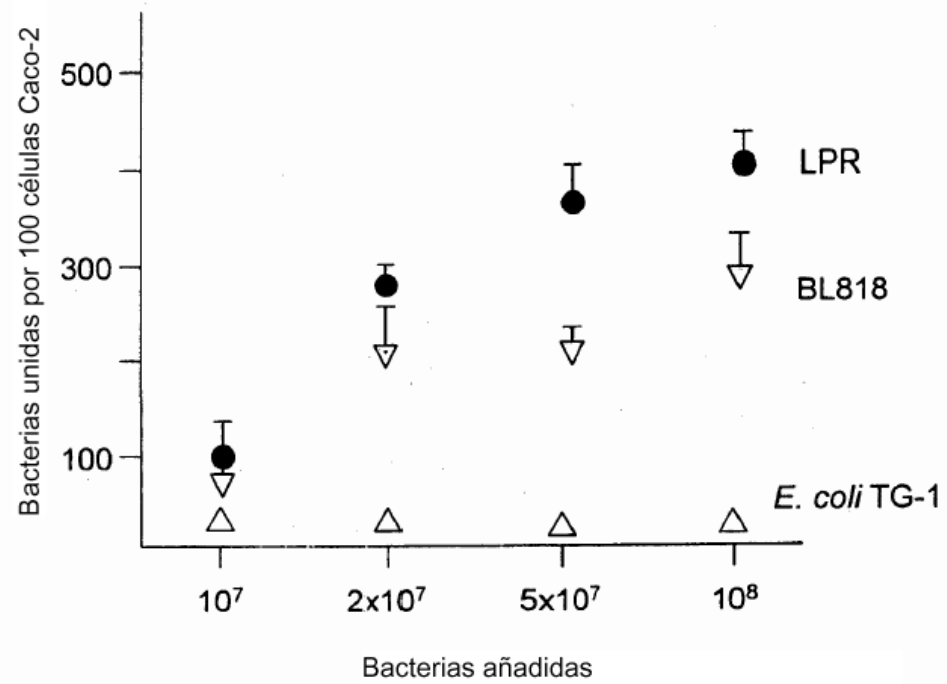
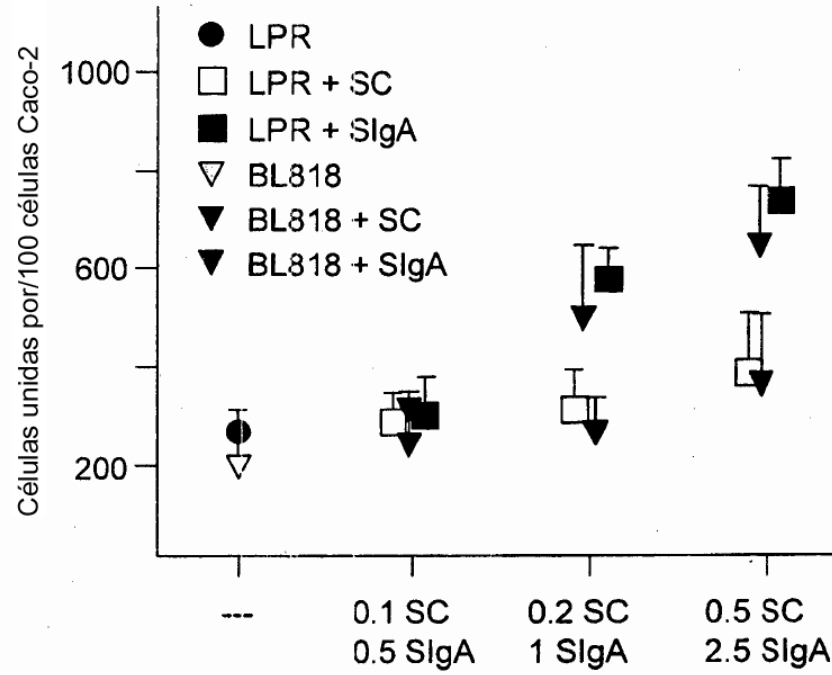


Figura 3:



2×10^7 LPR o BL818 combinado con varias cantidades de SC/SIgA (μg)
 Recordatorio: 1nM SC = 80 ng/ml; 1 nM SIgA = 400 ng/ml

Figura 4:

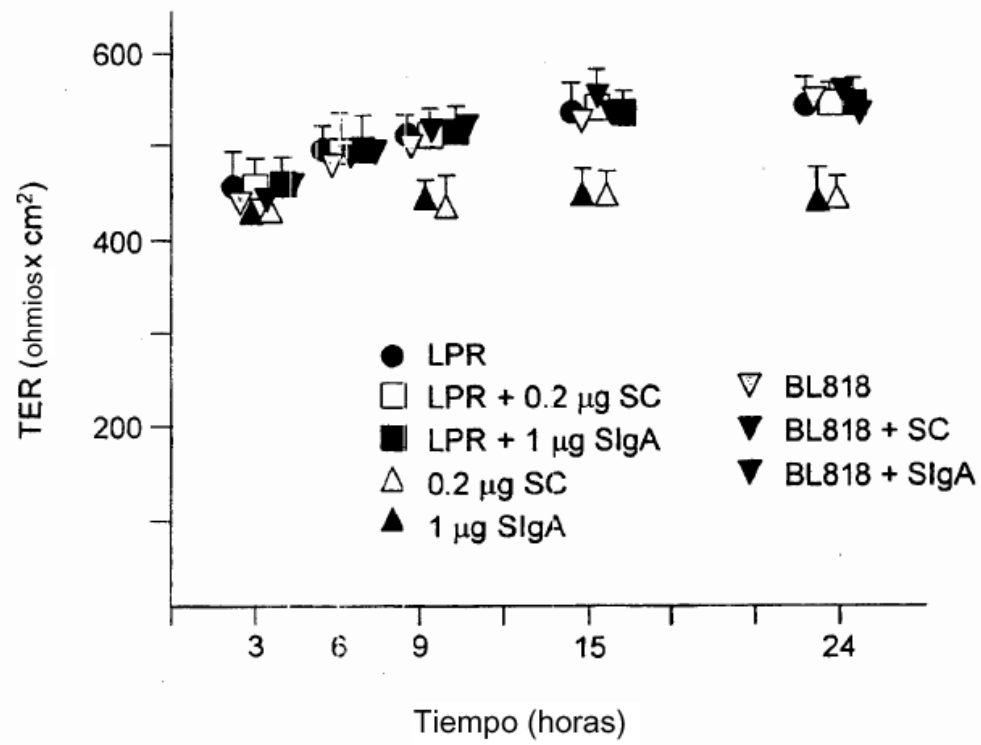


Figura 5

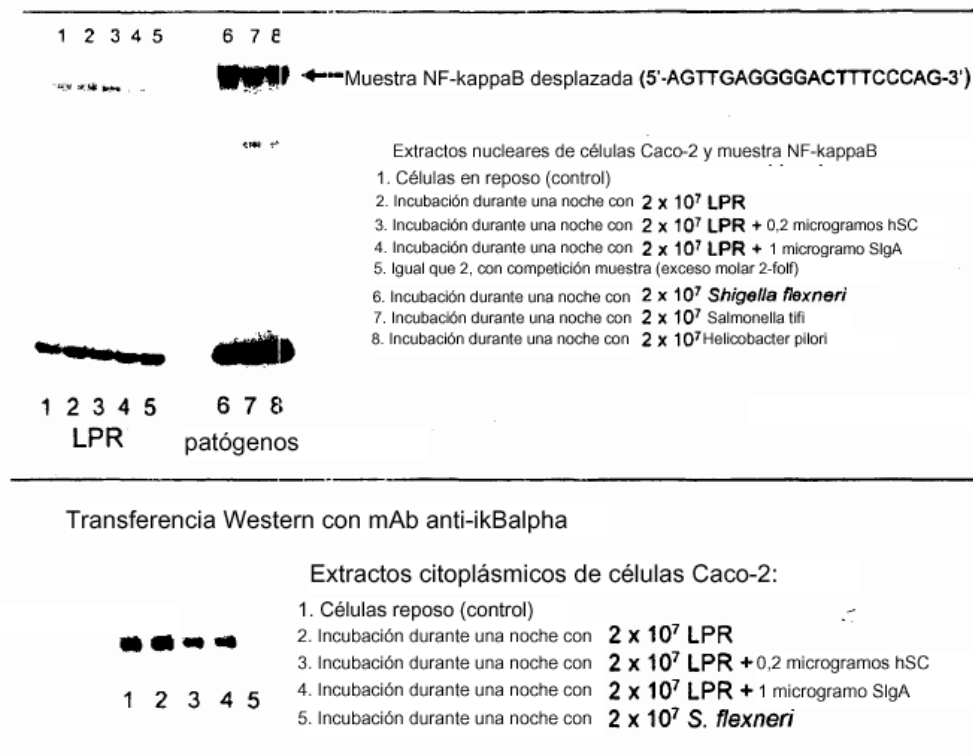


Figura 6:

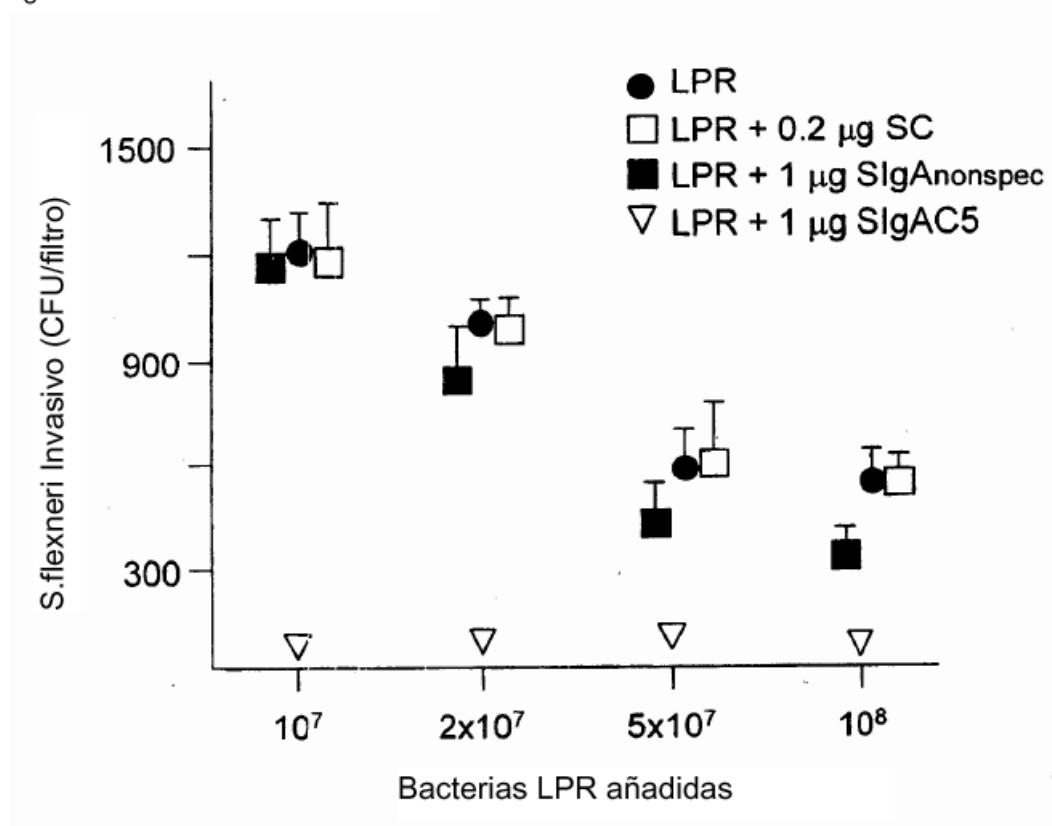


Figura 7:

