

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 882**

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 09769156 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2318047**

54 Título: **Probióticos, IgA secretora e infección**

30 Prioridad:

24.06.2008 EP 08158833

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

18.07.2014

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 2 477 882 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 secretora e infección

5 La presente invención se refiere, en general, al campo de la nutrición, la salud y el bienestar. En particular, la presente invención se refiere a probióticos y a maneras de aumentar su efectividad. Una realización de la presente invención se refiere a una combinación de probióticos con IgA secretora y a posibles usos de esta combinación.

10 Una infección es una colonización perjudicial de un organismo hospedador por especies foráneas. Normalmente, el organismo infeccioso intenta utilizar los recursos del hospedador para promover su propia multiplicación. Así, el organismo infeccioso, o patógeno, puede interferir con el funcionamiento normal del hospedador y puede llevar a más trastornos relacionados con la infección que pueden tener diversa gravedad y que pueden llevar, en el peor de los casos, a la muerte.

15 Si existe sinergia entre el organismo infeccioso y el hospedador, por la cual la relación es beneficiosa para el organismo infeccioso pero perjudicial para el hospedador, se califica de parasitismo.

20 La lista de enfermedades asociadas a la infección es enorme y los costes asociados con el tratamiento y la prevención de la infección son significativos.

Se considera que solamente el mercado de agentes antibacterianos en los Estados Unidos es de aproximadamente 26 billones de dólares americanos.

25 Hoy en día, una infección se puede tratar con la medicación apropiada. Sin embargo, para seleccionar la medicación apropiada es necesario definir el tipo de infección que se va a tratar. Las infecciones bacterianas a menudo se tratan con antibióticos antibacterianos. Si se toman los antibióticos antibacterianos equivocados por error para el tratamiento de una infección no vírica específica, no tratarán la infección y pueden ser incluso perjudiciales. Además, este tipo de medicación puede dar como resultado efectos secundarios no deseados y normalmente necesita la supervisión de personal médico.

30 Adicionalmente, un uso prolongado de antibióticos podría contribuir a la generación de especies infecciosas resistentes a los antibióticos. La revista Forbes expone en junio de 2006 que las infecciones resistentes a los fármacos matan a más americanos que el SIDA y el cáncer de mama juntos.

35 Por esta razón, un enfoque de investigación clave es el desarrollo de composiciones que puedan contribuir a reducir la necesidad de antibióticos en la sociedad.

40 Por consiguiente, en la técnica existe la necesidad de composiciones que no tengan antibióticos, que se puedan administrar preferentemente de forma diaria, sin efectos secundarios no deseados y que puedan usarse de forma segura para tratar o prevenir infecciones, sin la necesidad de definir primero la naturaleza exacta del agente causante.

45 Una forma de alcanzar este objetivo es mediante la administración de una composición alimentaria que comprenda probióticos.

50 Se sabe que los microorganismos probióticos tienen efectos beneficiosos en la salud y en el bienestar del hospedador. En las últimas décadas, el uso de bacterias probióticas ha adquirido una atención considerable como forma segura y accesible para tratar, por ejemplo, enfermedades gastrointestinales (Isolauri E, et al, Dig Dis Sci 1994, 39:2595-2600). La típica bacteria prebiótica que se ha empleado a este respecto pertenece al género Lactobacillus o Bifidobacterium.

55 La eficacia de los probióticos depende, en parte, de su agilidad para resistir las condiciones del tracto digestivo y para adherirse al epitelio intestinal. Además, un aspecto crítico que condiciona su posible efecto beneficioso para el hospedador es la comunicación del probiótico con el entorno del hospedador y su impacto sobre la barrera epitelial y su función.

60 Aunque algunos probióticos ya han conseguido resultados muy respetables en cuanto a colonización del tracto gastrointestinal, sería deseable disponer de una herramienta para mejorar aún más la efectividad con la cual los microorganismos probióticos colonizan el intestino.

65 Pan et al. (2007) "Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of Lactobacillus rhamnosus GG and antibodies" BMC Microbiology, 7 (1):86, desvelan la administración combinada de SIgA y al menos un microorganismo probiótico para la prevención de la diarrea producida por rotavirus, pero no menciona que SIgA y los probióticos estén presentes como complejos inmunitarios en la composición.

Pan et al. (2007) "Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea" J Infect Dis. 194(11): 1580-8, muestran que este tipo de lactobacilos transformados pueden ser útiles en el tratamiento profiláctico contra infecciones por rotavirus.

5 Phalipon et al. (2007) "Novel function for mucosal SIgA" Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A, Springer, 183-202, mencionan la administración oral de SIgA y presenta sus efectos como agente anti-infeccioso y anti-inflamatorio en el intestino.

10 Corthésy B. et al. (2003) "Recombinant secretory immunoglobulin A in passive immunotherapy: Linking immunology and biotechnology" Current Pharmaceutical Biotechnology 4 (1):51-67, notifican que la administración de SIgA previene infecciones de las mucosas y menciona la inmunización pasiva como una forma adecuada para administrar niveles protectores de SIgA directamente en la zona mucosa susceptible donde empieza la infección.

15 Corthésy B. et al. (1999 "Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development" Biological Chemistry 380 (11):1251-62, revisan los papeles de SIgA contra la infección por patógenos y la inflamación, y mencionan la inmunización pasiva con SIgA administrada por vía oral.

20 El documento WO 97/20577 se refiere a la administración combinada de anticuerpos y probióticos para el tratamiento de varios trastornos. El documento EP 1661983 está dirigido al uso de probióticos de *Lactobacillus* para la inmunoestimulación y la promoción de la producción de IgA. El documento WO 2007/019901 se refiere a la administración combinada de Ig y probióticos, como medicamento de producto alimentario, para el tratamiento de infecciones por virus o bacterias enteropatógenas. El documento EP 1854467 desvela composiciones para la inmunoestimulación y para la promoción de IgA y bifidobacterias que comprenden componentes secretores.

25 Por consiguiente, el objeto de la presente invención fue proporcionar a la técnica una composición que tuviera las mismas ventajas que la administración de probióticos a un sujeto necesitado de los mismos, pero que fuera aún más eficaz en el tratamiento o en la prevención de infecciones que solamente la administración de probióticos.

30 Los inventores de la presente invención han abordado esta necesidad y han descubierto que pueden alcanzar este objetivo mediante el uso de acuerdo con la reivindicación 1 y mediante una composición alimentaria de acuerdo con la reivindicación 12.

35 Por lo tanto, la presente invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento, reducción o prevención de infecciones no víricas, comprendiendo la composición IgA secretora y al menos un probiótico, donde el probiótico se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y donde la infección no viral es una infección bacteriana. También se describe en el presente documento una composición que comprende IgA secretora de anticuerpos y al menos un probiótico, y a su uso para tratar, modular, reducir y/o prevenir infecciones no víricas.

40 Los anticuerpos son normalmente glicoproteínas que reconocen a los antígenos específicamente. En los vertebrados se describen cinco clases de inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, todas las cuales difieren en su función en el sistema inmunitario. Se descubrió que la IgA secretora (SIgA), que es la inmunoglobulina predominante y más estable en las secreciones mucosas intestinales, era particularmente eficaz para el propósito de la presente invención.

45 Sin deseo de limitarse por ninguna teoría, los inventores creen que la SIgA y los probióticos pueden formar complejos que pueden potenciar la interacción de probióticos con el hospedador y aumentar su efecto beneficioso sobre la salud.

50 El mecanismo sugerido para la interacción de esta combinación con la mucosa intestinal del hospedador se presenta en la Figura 1.

La primera interacción de los probióticos con el hospedador se produce a nivel de la mucosa del intestino. Entre los criterios clave para la selección de un microorganismo probiótico está su capacidad para adherirse a la mucosa intestinal.

55 Esta adhesión parece ser necesaria para bloquear la entrada de patógenos y para contribuir a modular, por ejemplo, funciones inmunitarias protectoras.

60 Uno de los rasgos más característicos del sistema inmunitario de las mucosas en la mayoría de los mamíferos es la presencia dominante de anticuerpos secretores, particularmente IgA secretora (SIgA), una clase de anticuerpo que aparece únicamente en las mucosas.

65 La biosíntesis de la IgA polimérica se lleva a cabo en la lámina propia de la mucosa, y su transporte a través del epitelio que reviste las superficies mucosas se asegura por el receptor de Ig polimérica (pIgR) expresado por las células de la cripta y del epitelio columnar.

En las secreciones, una parte significativa del pIgR llamada componente secretor (SC) permanece asociada con la IgA polimérica, liberando SIgA.

5 La liberación de SIgA dentro del lumen es dependiente de la producción del SC, cuya expresión está regulada al alza después del nacimiento. El pIgR parece ser crítico para la estabilidad y el anclaje a la mucosa del anticuerpo (Phalipon et al. (2002) *Secretory component: A new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo*. *Immunity* 17:107-115).

10 Los recién nacidos, en los cuales apenas se detectan anticuerpos SIgA, dependen de la IgG materna transferida a través de la placenta, y de un suministro exógeno de SIgA que se encuentra en abundancia en la leche materna.

Conjuntamente, esto confiere inmunización pasiva al intestino, esencial para la protección del hospedador durante la fase de conformación y maduración del sistema inmunitario gastrointestinal.

15 De este modo, la composición para usar de acuerdo con la presente invención, o la composición alimentaria de la presente invención será particularmente beneficiosa para los recién nacidos y bebés (hasta los 2 años de edad), ya que por ellos mismos no producen suficiente cantidad de SIgA, sino que dependen de una fuente externa.

20 Los inventores actualmente creen que es esta asociación de SIgA con probióticos la que potencia la interacción de los probióticos con el hospedador, de manera que se mejoran los efectos beneficiosos para la salud del hospedador resultantes.

Los inventores de la presente invención han identificado anticuerpos de IgA secretora capaces de asociarse con cepas de bacterias comensales.

25 Los inventores de la presente invención han usado monocapas de células epiteliales Caco-2 *in vitro* para examinar de qué manera la SIgA favorece la comunicación entre bacterias no patógenas y la superficie epitelial. Como ensayos preliminares se evaluaron dos cepas probióticas representativas de los dos géneros principales *Lactobacilli* y *Bifidobacteria*, es decir, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818).

30 Se descubrió que cuando se asociaban la SIgA y/o el SC con probióticos, se promovía la interacción de los probióticos con el hospedador y se modulaban los procesos aguas abajo involucrados en los mecanismos de defensa.

35 Esto contribuye a aumentar los beneficios para la salud de los probióticos. Mediante la combinación con probióticos, la SIgA y/o el SC podrían ayudar a desencadenar de forma óptima reacciones de defensa del hospedador protectoras eficaces, incluyendo las respuestas contra infecciones por varios patógenos. Dado su efecto homeostático, la SIgA, combinada con probióticos, ayudará a desencadenar un efecto de refuerzo inmunológico contra infecciones previniendo al mismo tiempo cualquier proceso inflamatorio perjudicial potencial.

40 Por consiguiente, una realización de la presente invención es una composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1.

El tratamiento de infecciones no víricas incluye la reducción de infecciones no víricas.

45 El término "probiótico" significa preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del hospedador (Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. et al. "Probiotics: how should they be defined" *Trends Food Sci. Technol.* 1999:10 107-10).

50 De acuerdo con la presente invención, se pueden usar microorganismos probióticos seleccionados del grupo que consiste en *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, en particular seleccionados del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, y *Lactobacillus reuteri* o mezclas de los mismos, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* (NCC533; CNCM I-1225)

55 *Bifidobacterium longum* (NCC490; CNCM I-2170), *Bifidobacterium longum* (NCC2750; CNCM I-2618), *Bifidobacterium lactis* (2818; CNCM I-3446), *Lactobacillus paracasei* (NCC2461; CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007; CGMCC 1.3724), y mezclas de los mismos.

60 La composición para su uso de acuerdo con la presente invención o la composición alimentaria de la presente invención también pueden contener prebióticos. La adición de probióticos es beneficiosa ya que puede, cuando está combinada con probióticos, proporcionar efectos sinérgicos en cuanto a beneficios para la salud. Una composición que comprende una combinación de prebióticos y probióticos se conoce comúnmente como una composición simbiótica.

65 El término "prebiótico" significa sustancias alimentarias que promueven el crecimiento de probióticos en el intestino. No se descomponen en el estómago ni en el intestino delgado ni se absorben en el tracto GI de la persona que los

ingiere, sino que fermentan mediante la microflora gastrointestinal y/o los probióticos. Los prebióticos se definen, por ejemplo, por Glenn R. Gibson y Marcel B. Roberfroid, Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics, J. Nutr. 1995 125: 1401-1412.

5 Los prebióticos que pueden usarse de acuerdo con la presente invención no están limitados particularmente e incluyen todas las sustancias alimentarias que promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas tales como bifidobacterias o lactobacilos, y/o los probióticos presentes en el intestino. Preferentemente, pueden seleccionarse del grupo que consiste en oligosacáridos, que opcionalmente contienen fructosa, galactosa, manosa; fibras dietéticas, en particular fibras solubles, fibras de la soja; inulina; o mezclas de las mismas. Son prebióticos preferentes fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos de la soja, glucosilacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), palatinosa-oligosacáridos (PAO), malto-oligosacáridos, pectinas y/o hidrolizados de los mismos.

15 La infección no vírica de la presente invención es una infección bacteriana.

La infección no vírica puede ser una infección bacteriana seleccionada de una infección por *Escherichia coli*, una infección por *Vibrio cholerae*, una infección por Salmonella, una infección por clostridios o una infección por Shigella.

20 Las enfermedades infecciosas bacterianas típicas que se pueden tratar o prevenir mediante la presente invención incluyen: salmonelosis, shigelosis, fiebre tifoidea, meningitis bacteriana, ántrax, botulismo, brucelosis, campilobacteriosis, enfermedad por arañazo de gato, cólera, difteria, tífus epidémico, gonorrea, impétigo, legionelosis, lepra (enfermedad de Hansen), leptospirosis, listeriosis, enfermedad de Lyme, melioidosis, fiebre reumática, infección por MRSA, nocardiosis, pertussis (tos ferina), plaga, neumonía neumocócica, psitacosis, fiebre Q, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas (RMSF), escarlatina, sífilis, tétanos, tracoma, tuberculosis, tularemia, tífus y/o infecciones del tracto urinario.

30 El producto puede ser un producto alimentario, un producto alimentario animal o una composición farmacéutica. El producto, por ejemplo, puede ser una composición nutricional, un nutraceutico, una bebida, un aditivo alimentario o un medicamento.

Un aditivo alimentario o un medicamento pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas o un líquido. Los aditivos alimentarios o los medicamentos se proporcionan preferentemente como fórmulas de liberación sostenida que permiten un suministro constante de SIgA y probióticos durante periodos prolongados de tiempo.

35 El producto se selecciona preferentemente del grupo que consiste en productos basados en leche en polvo; bebidas instantáneas; fórmulas listas para beber; polvos nutricionales; líquidos nutricionales; productos basados en leche, particularmente yogures o helados; productos de cereales; bebidas; agua; café; cappuccino; bebidas de malta; bebidas con sabor a chocolate; productos culinarios; sopas; comprimidos; y/o jarabes.

40 La leche puede ser cualquier leche que pueda obtenerse de una fuente animal o vegetal y, preferentemente, es leche de vaca, leche humana, leche de oveja, leche de cabra, leche de yegua, leche de camella, leche de arroz o leche de soja.

45 En vez de usar leche, también se pueden usar fracciones de proteína procedente de la leche o calostro.

50 La composición puede contener además hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de película, materiales/agentes de encapsulación, materiales de la pared/cubierta, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, cargas, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, coadyuvantes de procesamiento (disolventes), agentes que proporcionan fluidez, agentes para enmascarar el sabor, agentes densificantes, agentes formadores de gelatina, agentes formadores de gel, antioxidantes y antimicrobianos. También pueden contener aditivos farmacéuticos y adyuvantes, excipientes y diluyentes convencionales, que incluyen, pero no están limitados a: agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, ligninsulfonato, talco, azúcares, almidón, goma arábiga, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes saborizantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, cargas, y similares. Además, pueden contener un material de vehículo orgánico o inorgánico apropiado para la administración por vía oral o por vía entérica, así como vitaminas, minerales, oligoelementos y otros micronutrientes de acuerdo con las recomendaciones de cuerpos gubernamentales tales como el USRDA.

60 La composición puede contener una fuente de proteína, una fuente de carbohidratos y/o una fuente de lípidos.

65 Se puede usar cualquier proteína dietética apropiada, por ejemplo proteínas animales (tales como proteínas de leche, proteínas de carne y proteínas de huevo); proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz, y proteína de guisante); mezclas de aminoácidos libres; o combinaciones de los mismos. Son

particularmente preferidas las proteínas de la leche, tales como, la caseína y el suero de la leche, y las proteínas de la soja.

5 Si la composición incluye una fuente de grasa, la fuente de grasa más preferentemente proporciona de un 5 % a un 40 % de la energía de la fórmula; por ejemplo de un 20 % a un 30 % de la energía. Se puede añadir DHA. Se puede conseguir un perfil de grasa apropiado usando una mezcla de aceite de canola, aceite de maíz y aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico.

10 Una fuente de carbohidratos puede proporcionar, más preferentemente, entre un 40 % y un 80 % de la energía de la composición. Se puede usar cualquier carbohidrato apropiado, por ejemplo, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas y mezclas de los mismos.

15 El producto preparado se puede administrar a seres humanos o a animales, en particular a animales de compañía, animales domésticos o ganado. Tiene efectos beneficiosos para cualquier grupo de edad. Preferentemente, el producto está destinado a los bebés, jóvenes, adultos o ancianos. Sin embargo, también puede administrarse a madres durante el embarazo y la lactancia para tratar al bebé.

20 La composición será eficaz siempre y cuando se administren simultáneamente probióticos y SIgA, en pocas palabras uno después del otro en un intervalo de tiempo máximo menor de 60 minutos, preferentemente menor de 30 minutos, más preferentemente menor de 15 minutos y aún más preferentemente menor de 5 minutos, y/o se combinan antes de la administración como un elemento ya presente en el producto alimentario.

25 Sin embargo, se descubrió que la combinación de probióticos y SIgA es particularmente eficaz si la SIgA y los probióticos se combinan en complejos antes de la administración. Esto tiene la ventaja de que los complejos beneficiosos no necesitan formarse después de consumir el producto, sino que ya están presentes en el producto alimentario.

30 Por consiguiente, una realización de la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende SIgA y probióticos, donde la molécula de SIgA y al menos un probiótico están al menos parcialmente asociados en la composición.

35 La SIgA y al menos un probiótico están presentes como complejos inmunitarios, por ejemplo de tal manera que al menos el 90 %, más preferentemente el 95 %, y aún más preferentemente todas las bacterias probióticas estén presentes como complejos inmunitarios en asociación con al menos 1 molécula de SIgA, por ejemplo con al menos 5 moléculas de SIgA.

40 La composición también puede contener al menos otro tipo de bacteria de calidad alimentaria, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, enterococos o mezclas de los mismos. Estas otras bacterias de calidad alimentaria pueden contribuir a conseguir una microflora intestinal sana y por esta razón contribuirán a conseguir el objetivo de la presente invención aún más eficazmente.

45 La presente invención también se refiere a una composición alimentaria que comprende SIgA y al menos un microorganismo probiótico, donde la IgA secretora y dicho al menos un probiótico están presentes como complejos inmunitarios en la composición, y donde el probiótico se selecciona del grupo que consiste en Bifidobacterium y Lactobacillus. Preferentemente, la SIgA y el microorganismo probiótico pueden estar presentes en una relación estequiométrica de al menos 10:1, preferentemente de al menos 100:1, y más preferentemente de al menos 2000:1 a 10000:1. El límite superior de saturación de SIgA se determina por la superficie de los microorganismos probióticos y por el número de sitios de unión disponibles para SIgA.

50 Generalmente, los probióticos serán eficaces en un gran intervalo de cantidades. Si las bacterias alcanzan vivas el intestino, una sola bacteria puede ser suficiente para conseguir un efecto potente al persistir en el intestino y multiplicarse. Sin embargo, se prefiere generalmente que el producto comprenda entre 10^2 y 10^{10} células de probióticos por cada dosis diaria.

55 Igualmente, tampoco está limitada la cantidad de SIgA necesaria para conseguir un efecto. En principio, será eficaz, una molécula de SIgA combinada con un microorganismo probiótico, preferentemente en la forma de un complejo. Sin embargo, en general, se prefiere que el producto comprenda entre 0,0001 mg de SIgA secretora y 10 mg de SIgA secretora por cada dosis diaria.

60 Los expertos en la materia entenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención descritas en el presente documento, sin apartarse del alcance de la invención según se desvela. En particular, las características descritas para la composición para usarse de acuerdo con la presente invención se pueden aplicar a la composición alimentaria de la presente invención y viceversa.

65 Las ventajas y las características adicionales de la presente invención se muestran en los siguientes ejemplos y figuras.

La figura 1 muestra esquemáticamente de qué manera se cree que la SIgA mejora los efectos de bacterias comensales, cuando se asocia con ellas mediante el aumento de la interacción con la mucosa intestinal del hospedador.

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

La Figura 3 muestra el resultado de experimentos que prueban las propiedades de unión de dos cepas de probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818), representativas de los dos géneros principales Lactobacilli y Bifidobacteria, a células epiteliales y la influencia de la IgA secretora (SIgA) o del componente secretor (SC). Los datos se expresan como medias de UFC por cada 100 células Caco-2 \pm SEM.

La figura 4 muestra el resultado de un experimento que prueba el efecto de dos cepas de probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818), representativas de los dos géneros principales Lactobacilli y Bifidobacteria, por sí mismas o en combinación con SIgA o con SC, sobre la resistencia eléctrica transepitelial (TER) que mide la permeabilidad epitelial. Los datos se expresan como medias de ohmios por cada $\text{cm}^2 \pm$ SEM.

La figura 5 muestra el resultado de un experimento que prueba el efecto de LPR, combinado o no con SIgA o con SC, sobre la activación de NF- κ B en una monocapa de células Caco-2. El descenso de la actividad de unión a NF- κ B es un indicativo de la atenuación de una o más vías inflamatorias dentro de las células Caco-2.

La figura 6 muestra el resultado de un experimento que prueba el efecto de LPR, combinado o no con SIgA o con SC, sobre la invasión por *S. flexneri* de células Caco-2. Se usaron dos moléculas de SIgA monoclonal: una SIgA no específica (SIgA no-espec) que reconoce un epítipo de *Salmonella*, y la SIgAC5 anti-*S. flexneri* específica. Los datos se expresan como medias de UFC por cada filtro Transwell \pm SEM.

La Figura 7 muestra el resultado de un experimento que prueba el efecto de los probióticos sobre la expresión del receptor de Ig polimérica (pIgR) en una monocapa de Caco-2. Diferentes tratamientos probados a 16 h, incluyendo una combinación de probióticos con SIgA no específica y una combinación de *S. flexneri* con SIgA anti-*S. flexneri* específica. (A) Diferentes tratamientos probados a 16 h, incluyendo una combinación de probióticos con SIgA no específica y una combinación de *S. flexneri* con SIgA anti-*S. flexneri* específica. La presencia de pIgR se evaluó mediante western Blot, así como la β -actina. (B) Análisis semicuantitativo de los niveles de expresión de pIgR normalizados con respecto a la β -actina mediante análisis densitométrico de las bandas identificadas en los geles en A. (C) Cinética de la expresión de pIgR durante una incubación de 24 h de células Caco-2 con varias preparaciones, según lo medido mediante ELISA.

Ejemplo 1:

UNIÓN A CÉLULAS EPITELIALES

Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por cm^2 de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 16 h a 37 °C en ausencia de antibiótico o FCS con diferentes dosis de bacterias, como se indica en la leyenda de la figura. Se utilizaron cultivos recientes de una noche de bacterias LPR, BL818 y *E. coli* TG-1. Después, las células se lavaron antes de enumerarse. Las bacterias unidas se contaron mediante cultivo en placas de MRS o de LB. Para cada experimento, se realizaron pruebas por triplicado. Los datos se expresaron como medias de bacterias unidas por cada 100 células Caco-2 \pm SEM. Se realizaron triplicados para cada experimento. En un experimento posterior, las células se incubaron con 2×10^7 bacterias durante 16 h a 37 °C, en presencia de dosis crecientes de SIgA o de SC, tal como se indica en la leyenda de la figura 3. Después, las células se lavaron antes de enumerarse. Las bacterias unidas se contaron colocando mediante cultivo en placas de MRS o de LB. Para cada experimento, se realizaron pruebas por triplicado. Los datos se expresaron como medias de bacterias unidas por cada 100 células Caco-2 \pm SEM. Se realizaron triplicados para cada experimento.

Se observa una unión preferente a células Caco-2 polarizadas por parte de LPR o de BL818 en comparación con *E. coli* TG-1 (figura 2). Hay una capacidad de unión de probióticos a células epiteliales intestinales dependiente de la dosis. Se puede observar que las propiedades de unión podrían diferenciarse entre las dos cepas.

Para experimentos posteriores se usaron 2×10^7 UFC de probióticos ya que, por un lado, esta cantidad no producía ningún cambio de pH en el medio y, por otro lado, mostraba una relación de unión eficaz.

El aumento de la dosis de SIgA monoclonal potenciaba la capacidad tanto de LPR como de BL818 para unirse a monocapas de células Caco-2 polarizadas. Cuando se asociaban con las bacterias, los componentes secretores no

mostraban este tipo de propiedades (figura 3). Para experimentos posteriores, se eligió una dosis de 1 µg de SIgA que confiere una mejora significativa en la capacidad de unión del probiótico. Esta dosis lleva a la formación de un complejo final constituido por aproximadamente 50.000 a 10.000 unidades de SIgA por bacteria.

5 Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3.

Ejemplo 2:

10 FUNCIÓN DE BARRERA EN LA MONOCAPA DE CÉLULAS CACO-2 POLARIZADAS

10 Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por cm^2 de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C con 2×10^7 UFC de bacterias en ausencia de antibiótico o de FCS. Las bacterias se probaron solas o combinadas con SIgA o con SC a las concentraciones indicadas en la leyenda de la figura 4. Se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TER) a las 3, 6, 9, 15 y 24 h. Los controles incluyen la incubación con SIgA y con SC solamente. Se realizaron triplicados para cada experimento.

15 Se consiguió un aumento del 20-25 % en resistencia eléctrica transepitelial (TER) con la incubación de la monocapa de células Caco-2 polarizadas con LPR o BL818 solamente, lo que sugiere que los probióticos potenciaban la función de la barrera epitelial. Esto siguió siendo así cuando las bacterias se combinaron con SIgA o SC (figura 4). Por sí mismos, la SIgA o el SC no producían ningún cambio en TER.

20 Los resultados se muestran en la figura 4.

Ejemplo 3:

25

ACTIVACIÓN DE NF-κB EN LA MONOCAPA DE CÉLULAS CACO-2 POLARIZADAS

30 Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por cm^2 de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 16 h a 37 °C con 2×10^7 UFC de LPR en ausencia de antibiótico o de FCS. Las bacterias se probaron solas o combinadas con SIgA o con SC a las concentraciones indicadas en la leyenda de la figura 5. Se usaron *S. flexneri*, *S. typhi* y *H. pylori* (2×10^7 UFC) como patógenos pro-inflamatorios en experimentos de control. Se prepararon extractos nucleares y se analizaron mediante ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) para examinar la unión de NF-κB a una sonda específica de ADN. Se obtuvieron extractos citoplásmicos en paralelo y la presencia de IκBα se analizó mediante Western Blot, usando un anticuerpo monoclonal específico anti-IκBα contra la proteína.

35 La exposición de monocapas de células Caco-2 polarizadas a bacterias patógenas llevó a una activación de NF-κB nuclear mucho más pronunciada en comparación con bacterias no patógenas (figura 5).

40 La desaparición de IκBa (panel inferior) refleja la activación de la ruta que lleva a la translocación nuclear de NF-κB. A este respecto, aunque LPR por sí mismo tiene un efecto leve sobre la activación de NF-κB, la combinación de LPR con SIgA o con SC redujo la activación de NF-κB en las células Caco-2 (no se probó BL818). Como se esperaba, la incubación de células epiteliales con el patógeno *S. flexneri* llevó a la desaparición completa de la expresión de IκBα.

45 Los resultados se muestran en la figura 5.

Ejemplo 4:

50 ACTIVIDAD ANTIPATÓGENA

50 Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por cm^2 de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 16 h a 37 °C con 2×10^7 UFC de LPR en ausencia de antibiótico o de FCS. Se hicieron pruebas con LPR, por sí mismo o combinándolo con 0,2 µg de SC, con 1 µg de SIgA policlona o con 1 g de SIgAC5 específica anti-LPS de *S. flexneri*. Después de la incubación con LPR, las células se lavaron y luego se incubaron con 10^7 *S. flexneri* durante 6 horas, se volvieron a lavar y se incubaron con 50 g/ml de gentamicina durante 45 min. Finalmente, las células se lisaron y se enumeraron las *S. flexneri* intracelulares en placas de agar LB. Se realizaron triplicados para cada experimento.

60 La adición de LPR redujo la infección de la monocapa de células Caco-2 polarizadas por *S. flexneri* de forma dependiente de la dosis. El efecto se potenció en gran medida tras la combinación con SIgA. Se consiguió la prevención completa de la infección cuando se usó el anticuerpo SIgAC5 específico de LPS de *S. flexneri* (figura 6).

65 Los resultados se muestran en la figura 6.

Ejemplo 5:

Expresión de un receptor de Ig polimérica en la monocapa de células Caco-2 polarizadas

5 Se sembraron aproximadamente 10^6 células Caco-2 por cm^2 de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 16 h a 37°C con 2×10^7 UFC de LPR o BL818 en ausencia de antibiótico o de FCS. Se hicieron pruebas con probióticos, por sí solos o combinándolos con $0,2 \mu\text{g}$ de SC o con $1 \mu\text{g}$ de SIgA policlona. Se hicieron pruebas con *S. flexneri* de control, solo o combinado con $1 \mu\text{g}$ de SIgAC5 específica anti-LPS de *S. flexneri*. Después del lavado, las células Caco-2 se recuperaron directamente del filtro Transwell y se lisaron. Se retiraron los núcleos, y los restos celulares y los citoplasmas se analizaron mediante Western Blot usando un anticuerpo anti-pIgR y antisueros contra SC humano y β -actina como controles. Se realizaron triplicados para cada experimento.

15 En un experimento posterior, las células se incubaron siguiendo el mismo procedimiento y después se recuperaron del filtro Transwell después de incubarse durante 8, 16 y 24 horas. Se realizó el análisis cuantitativo de pIgR mediante ELISA sobre fracciones de restos celulares/citoplasma. Se determinaron las proteínas totales mediante el ensayo de proteína BCA. Los valores se normalizaron con respecto al contenido de proteína y los datos se expresaron como medias de ng de pIgR/mg de proteína total \pm SEM.

20 Se normalizó la expresión de pIgR en células epiteliales con respecto a la expresión de β -actina. Según lo revelado mediante Western Blot (panel superior) y mediante el análisis densitométrico de las señales respectivas (panel inferior), hubo un aumento del nivel de pIgR tras la exposición durante una noche de monocapas de células Caco-2 polarizadas a combinaciones de LPR o de BL818 con SIgA o con SC en comparación con probióticos solos (figura 7a). La SIgAC5 específica anti-LPS de *S. flexneri* previno la interacción del patógeno con la monocapa de células Caco-2 polarizadas, explicándose así el descenso en la expresión de pIgR en comparación con el tratamiento con *S. flexneri* solo.

30 Los resultados mostraron además un aumento dependiente del tiempo del nivel del receptor de Ig polimérica (pIgR) tras la exposición de monocapas de células Caco-2 polarizadas a combinaciones de probióticos con SIgA o con SC (figura 7b).

Los resultados se muestran en la figura 7.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para usarse en el tratamiento, la reducción o la prevención de infecciones no víricas, comprendiendo la composición IgA secretora y al menos un probiótico, donde el probiótico se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y donde la infección no vírica es una infección bacteriana.
- 10 2. Composición para usarse de acuerdo con la reivindicación 1, donde la infección no vírica es una infección bacteriana seleccionada de una infección por *Escherichia coli*, una infección por *Vibrio cholerae*, una infección por salmonella, de una infección por clostridios o una infección por Shigella.
- 15 3. Composición para usarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde el probiótico se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces* o mezclas de los mismos, en particular se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus reuteri*, o mezclas de los mismos, preferentemente seleccionados 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 rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007; CGMCC 1.3724), y mezclas de los mismos.
- 20 4. Composición para usarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde la composición es un producto alimentario o una composición farmacéutica.
- 25 5. Composición para usarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde la composición está destinada al consumo por seres humanos, en particular bebés, jóvenes, adultos o ancianos.
- 30 6. Composición para usarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde la IgA secretora y dicho al menos un probiótico están al menos parcialmente asociados en la composición.
- 35 7. Composición para usarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde se mejoran las funciones inmunitarias.
8. Composición para usarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde la composición comprende al menos otro tipo de otra bacteria de calidad alimentaria, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, enterococos o mezclas de los mismos.
- 40 9. Composición para usarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde la composición contiene además al menos un prebiótico, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en oligosacáridos.
- 45 10. Composición para usarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde la composición comprende entre 10^2 y 10^{10} células de probióticos por cada dosis diaria.
11. Composiciones para usarse de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde la composición comprende entre 0,0001 mg de IgA secretora y 10 mg de SIgA por cada dosis diaria.
- 50 12. Composición alimentaria que comprende SIgA y al menos un microorganismo probiótico, donde la IgA secretora y dicho al menos un probiótico están presentes como complejos inmunitarios en la composición, y donde el probiótico se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

Figura 1:

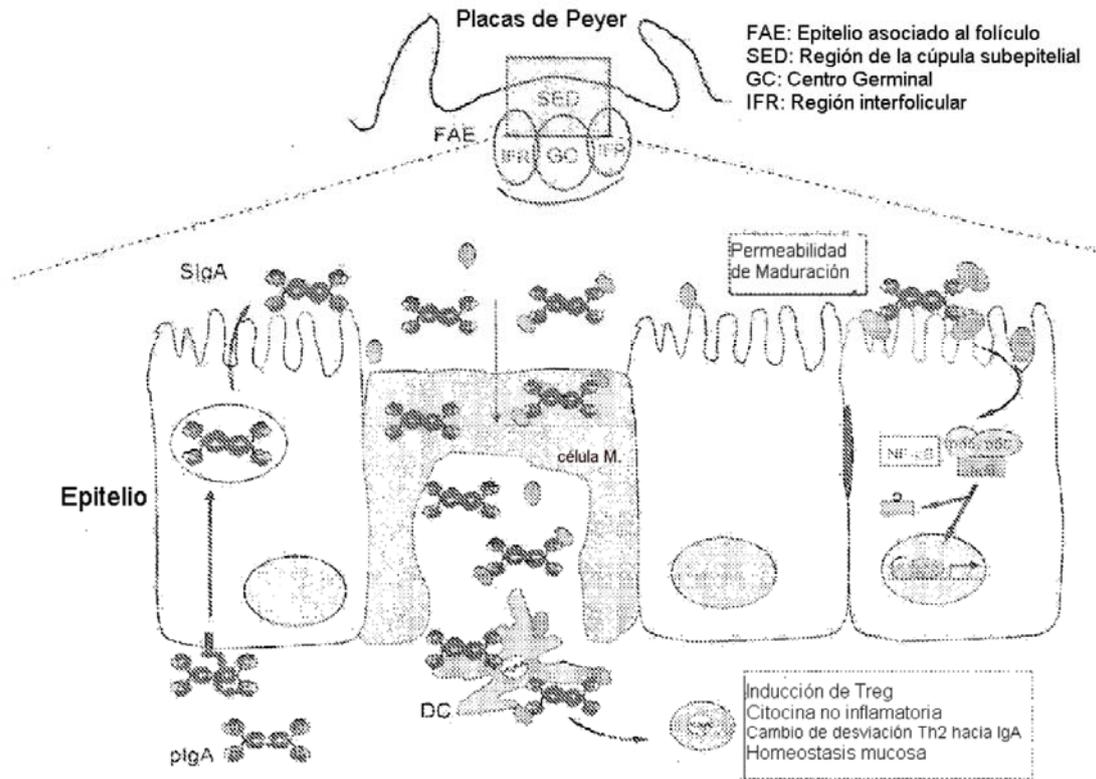


Figura 2:

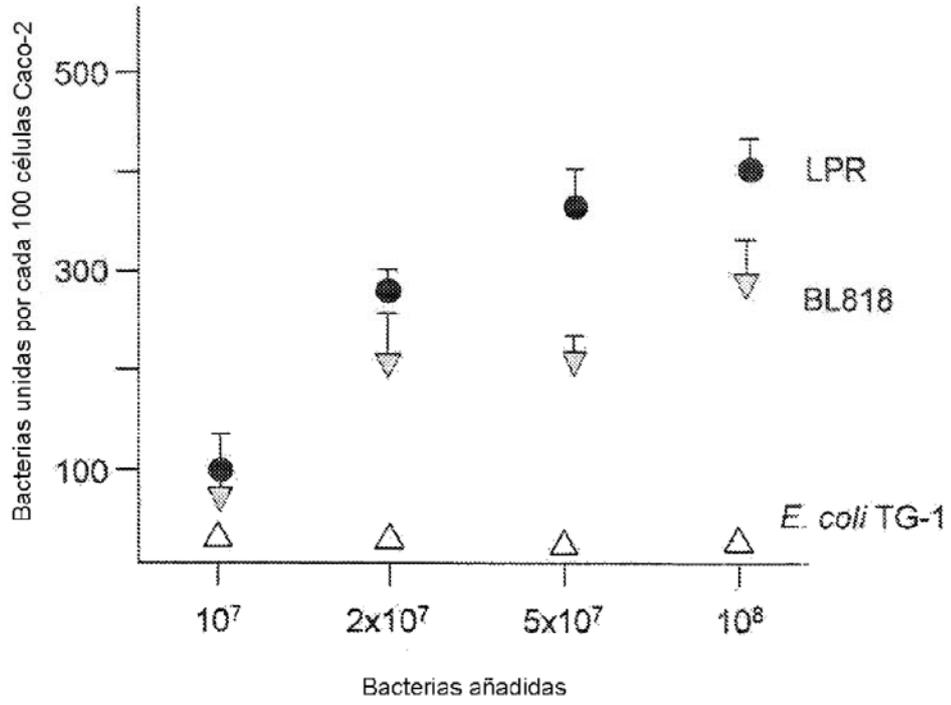


Figura 3:

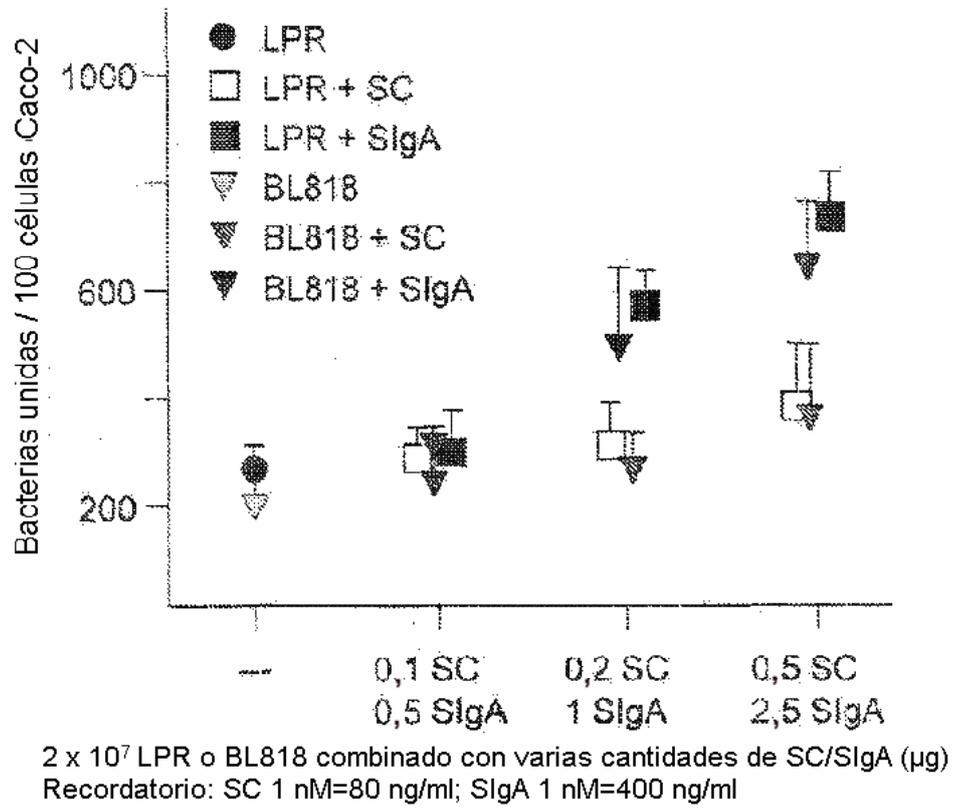


Figura 4:

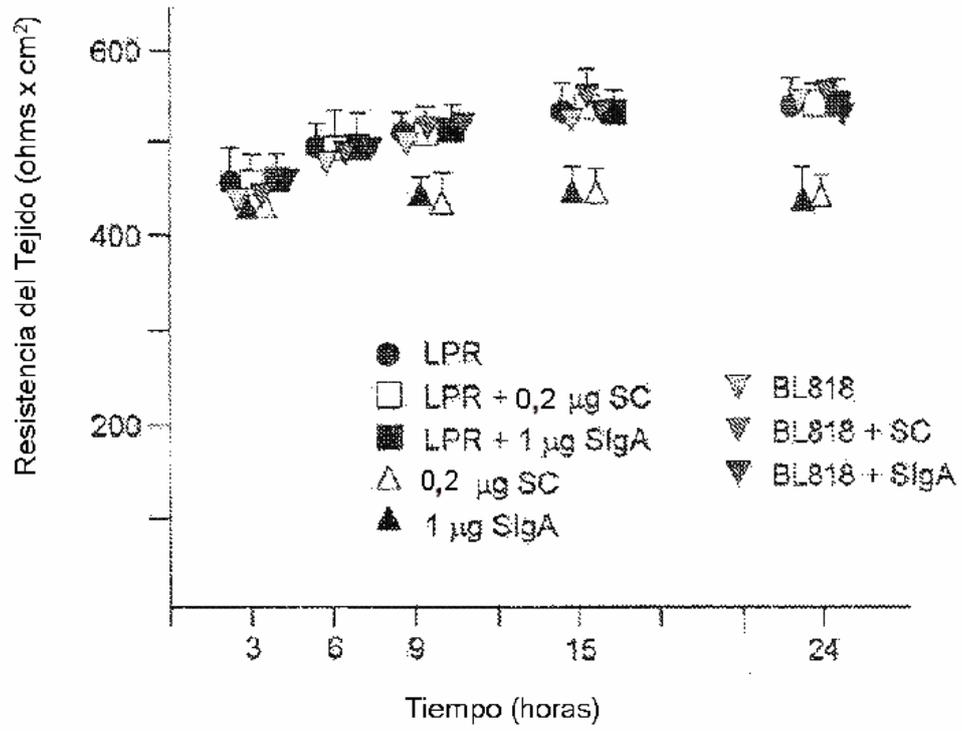


Figura 5:

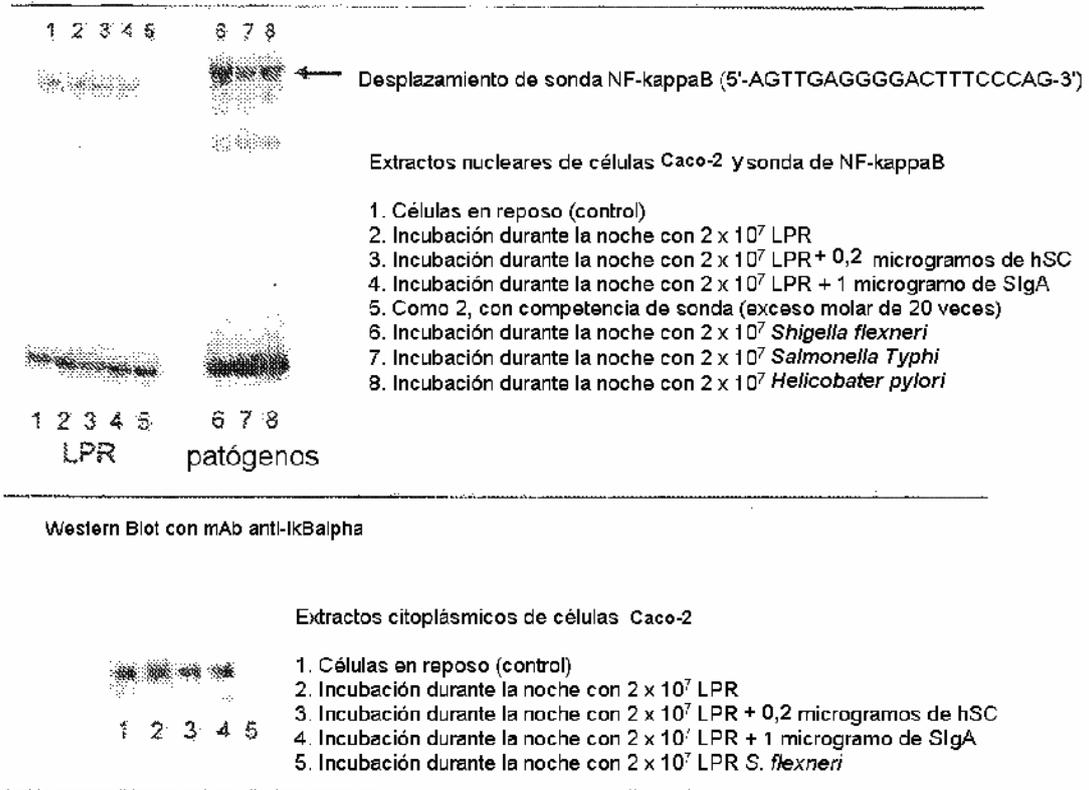


Figura 6:

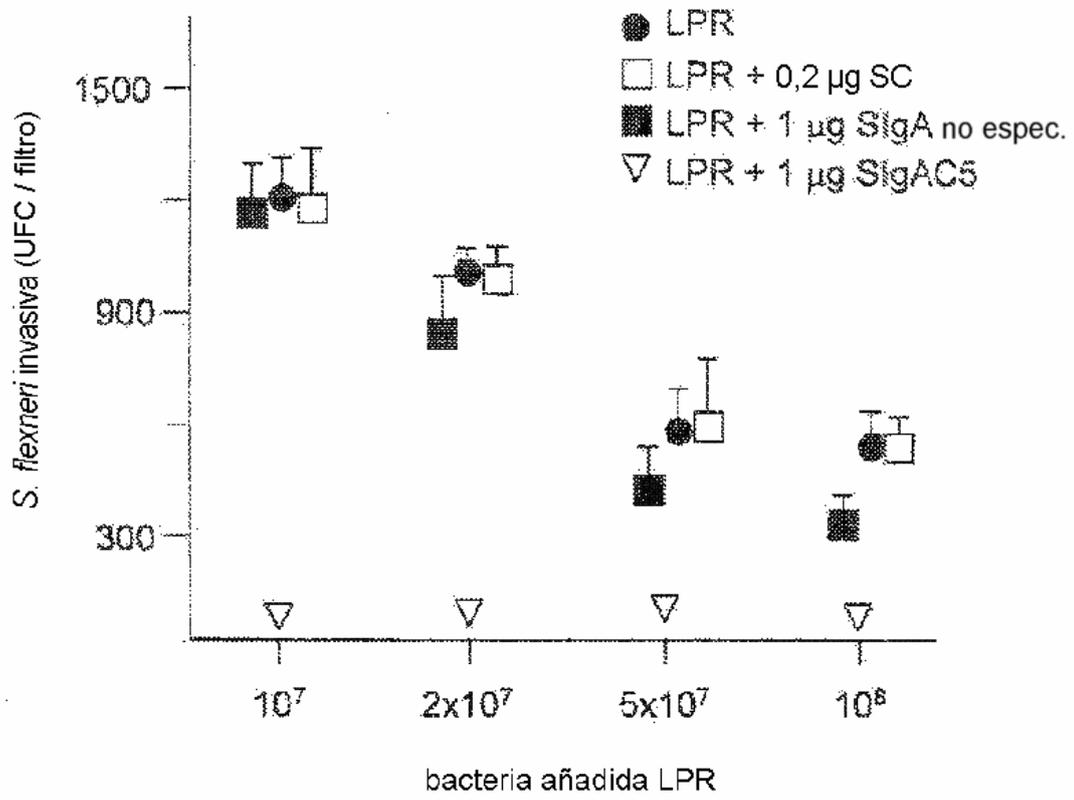


Figura 7:

