

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 490**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/29** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**A23K 1/00** (2006.01)  
**A23K 1/18** (2006.01)  
**A23L 1/305** (2006.01)  
**A23L 1/308** (2006.01)  
**A23K 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2010 E 10744565 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2467031**

54 Título: **Una composición nutritiva, la cual comprende cepas de Lactococcus y que reduce los síntomas de alergia, especialmente, en lactantes y en niños**

30 Prioridad:

**18.08.2009 EP 09168053**  
**17.09.2009 EP 09170599**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.11.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HOLVOET, SÉBASTIEN;**  
**MERCENIER, ANNICK;**  
**ZUERCHER, ADRIAN y**  
**SINGH, ANURAG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 518 490 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

Una composición nutritiva, la cual comprende cepas de Lactococcus y que reduce los síntomas de alergia, especialmente, en lactantes y en niños

5

Sector de la invención

La presente invención, se refiere al sector de los probióticos, de una forma especial, a las cepas de Lactococcus, en la fabricación de una composición nutritiva para reducir los síntomas alérgicos en pacientes alérgicos, cuando éstos se exponen a alérgenos.

10

Antecedentes y trasfondo de la invención

Las alergias, se encuentran entre los problemas de salud más comunes, los cuales afectan a la vida de los pacientes de todas las edades. Las enfermedades alérgicas, están reconocidas, hoy en día, por parte de la Organización Mundial de la Salud, como siendo enfermedades epidémicas. La prevalencia de las alergias, ha mostrado el hecho de irse incrementando, en las pasadas décadas. El estilo de vida actual, de una forma especial, en cuanto a lo referente a la vida urbana, se ha venido asociando con la alta prevalencia y la alta gravedad de las manifestaciones alérgicas. La sensibilización alérgica, en la infancia temprana, y especialmente, a los alérgenos de los productos alimenticios, es crítica, y ésta presenta un alto interés, ya que, el desarrollo de un "fenotipo alérgico", o "atopía", ha mostrado el hecho de facilitar una subsiguiente sensibilización a otros alérgenos. Así, de este modo, las alergias, en lo infancia, puede ser la primera etapa de una cascada alérgica, la cual conduzca a múltiples enfermedades, posteriormente, en la vida, a la cual se le hace referencia, de una forma usual, como "La marcha atópica". Así, por ejemplo, se ha demostrado el hecho de que, en los cohortos o grupos de edad, de los seres humanos, los niños con un hipersensibilidad temprana, a los productos alimenticios, tienen un riesgo dramáticamente incrementado en cuanto al hecho de desarrollar, en la vida, una rinitis alérgica (con fiebre alta), o un asma tardía, en la infancia (véase, a dicho efecto, el trabajo de Ostblöm et al, del año 2008). Los niños afectados de formas suaves de hipersensibilidad a los productos alimenticios, tienen así mismo, también, un riesgo incrementado, en cuanto al hecho de desarrollar alergias respiratorias, pero en un menor grado que en los niños afectados de una hipersensibilidad persistente a los productos alimenticios. Así, por lo tanto, el hecho de atenuar la gravedad de la hipersensibilidad a los productos alimenticios, puede ser crucial, para enlentecer la "marcha atópica".

15

20

25

30

En este contexto, el control de los episodios alérgicos y la prevención de las alergias, en la niñez y en la temprana infancia, son de la mayor importancia.

35

El sistema inmune de los niños pequeños y lactantes, se desarrolla, de una forma activa, a lo largo de los primeros años de vida. El hecho de actuar, prevenir, evitar, controlar, reducir o modular las reacciones alérgicas, en dichos pacientes tan pequeños, puede influir en su perfil alérgico a corto plazo, pero, así mismo, también, a largo plazo, para su vida posterior.

40

La prevención de las alergias, puede llevarse a cabo en diferentes niveles.

La "prevención primaria", es el efecto de prevenir o de reducir el riesgo de sensibilización de los pacientes, a los alérgenos, la cual se caracteriza por la ausencia o los reducidos niveles de anticuerpos i.e., específicos de las alérgenos. La prevención o la reducción de la sensibilización, tendrá como resultado, la ausencia o la reducción de los síntomas alérgicos, en la exposición al mismo alérgeno. Mediante la modulación de la forma, mediante la cual, el paciente se sensibiliza, con respecto a uno de los alérgenos de un grupo de alérgenos (prevención primaria), puede también modularse, así mismo, también, la subsiguiente respuesta alérgica.

45

50

La "prevención secundaria", es el efecto de la modulación de los síntomas de las alergias, a saber, la existencia o la intensidad de la reacción alérgica, en un paciente, el cual está ya sensibilizado a uno o a varios alérgenos, cuando el paciente se vuelve a exponer al citado (o a los citados) alérgeno(s), mediante la modulación de la existencia de la intensidad de los síntomas alérgicos (prevención secundaria), se minimiza la inconveniencia asociada con las alergias.

55

Dados estos distintos conceptos de la prevención de las alergias, y en virtud de sus mecanismos inherentes de acción, puede llegarse a la hipótesis de que, algunos compuestos, podrían actuar únicamente en uno o en ambos de estos niveles específicos de prevención. Algunos de ellos, podrían, por ejemplo, únicamente reducir la sensibilización a un alérgeno específico (prevención primaria), mientras que, otros compuestos, podrían únicamente tener un efecto en la prevención secundaria, y reducir la gravedad de las reacciones alérgicas. Otros compuestos, podrían ser capaces de influenciar sobre ambos, la sensibilización y los síntomas y, así, de este modo, ser efectivos en fomentar la prevención primaria y la prevención secundaria. Así mismo, también, los compuestos los cuales ejercen un efecto beneficioso en cuanto al hecho de reducir los síntomas, en una forma de alergia, podrían funcionar, o no, para las diferentes alergias provocadas por un alérgeno diferente.

60

65

Los alérgenos de los productos alimenticios, se encuentran entre los primeros alérgenos que los niños de corta edad o los lactantes, encuentran en su vida temprana. Las proteínas de la leche, se encuentran, de hecho, entre las causas más frecuentemente observadas, para la alergia a los productos alimenticios, en la infancia o la niñez, seguido de la alergia a las proteínas de los huevos y del trigo. De una forma general, las alergias a los productos alimenticios, puede manifestarse mediante unos síntomas cutáneos (las erupciones, el eczema, y otros), y mediante unos síntomas gastrointestinales (los calambres abdominales; el dolor, de una forma especial, en el abdomen; los vómitos), en los lactantes y en los niños de corta edad. Pueden también así mismo aparecer, también, sensibilización y episodios de alergias, cuando el lactante / niño de corta edad, si éstos se exponen a nuevos productos alimenticios, tales como los consistentes en los cereales, los vegetales, la frutas, las nueces o frutos secos, o el pescado.

Los alérgenos respiratorios (es decir, los denominados, "alérgenos aéreos"), son ubicuos. Éstos pueden tanto ser de origen estacional (tal como por ejemplo el polen), o perennes (los ácaros presentes en la materia en polvo casera, las cucarachas, la caspa de los animales domésticos, los mohos y los hongos). Éstos provocan síntomas respiratorios alérgicos, los cuales pueden manifestarse como síntomas nasales, (tales como los consistentes en la secreción nasal, el picor, los estornudos, el bloqueo / la obstrucción), o como síntomas oculares (tales como los consistentes en los ojos llorosos, el picor, el enrojecimiento), en los niños y en las personas adultas.

Los Lactococci (Lactococcus), son bacterias lácticas productoras del ácido láctico tradicionales. Se ha demostrado el hecho consistente en que, cepas específicas de los lactococci, pueden conferir un beneficio para la salud y, así, de este modo, estas cepas, se consideran como siendo probióticos, bajo la definición amparada por la VHO (Organización Mundial de la salud - [VHO, del inglés World Health Organization] - ). Así, por ejemplo, un efecto antialérgico, se ha atribuido como perteneciendo a una cepa particular de Lactococcus. Makoto Enomoto et al. han descrito, en el documento de solicitud de patente británica GB 2 077 101 A (publicada en fecha 16 de Diciembre de 1981), una composición antialérgica, la cual comprende una "lactobacteria" que pertenece al género Streptococcus, la cual es la designación anterior de Lactococcus y (es decir, la lactobacteria Streptococcus lactis, se denomina, en la actualidad, Lactococcus lactis).

De una forma adicional, se han descrito varios cultivos probióticos o mezclas de probióticos, debido a su efecto en el sistema inmune alérgico: así, por ejemplo, el documento de patente europea EP 1 858 336 (documento de patente internacional WO 2006 697 949), describe una mezcla de probióticos, la cual puede hacer disminuir el riesgo de las alergias debidas a la globulina y a la albúmina de la harina de trigo. El documento de patente japonesa JP2006 028 050, describe las propiedades supresoras de la alergia en la piel, de las composiciones las cuales comprenden bacterias prebióticas, tales como las consistentes en los lactobacillus (lactobacilos) y los Streptococcus (Streptococos)

El documento de patente estadounidense U S 2008 / 0 305 089, describe composiciones farmacéuticas, las cuales comprenden las especies Lactococcus y Acinetobacter, para la prevención de trastornos o desórdenes alérgicos.

Síntomas en la población de los niños de corta edad y los lactantes. Esto es especialmente importante, cuando se considera la maduración de ambos, los sistemas intestinal e inmune, que se experimentan en los niños de corta edad o los lactantes, y cuando se considera la multiplicidad de nuevos alérgenos a los cuales se encuentran expuestos los niños de corta edad o los lactantes, especialmente, en el momento del destete.

La cuestión de las reacciones alérgicas natas de los alimentos, en la corta edad, se complica todavía más, mediante las necesidades nutricionales específicas de los lactantes y de los niños de corta edad. La ingesta calórica, la densidad calórica, la variedad de los nutrientes deseables, el contenido de proteínas y la calidad de las proteínas, se encuentran entre los factores que son de importancia, para proporcionar la nutrición más apropiada a los lactantes y a los niños de corta edad. La presencia de micronutrientes, tales como los consistentes en las vitaminas y en los minerales, son también de importancia, de una forma más específica, cuando su concentración, se encuentra limitada mediante rangos o márgenes recomendados, correspondientes a la edad de los pacientes objetivizados como diana. Como tales, para los niños de corta edad y los lactantes, las matrices del suministro de alimentos, son inherentemente complejas, pero éstas son, también, de una menor variedad: así, por ejemplo, los lactantes, si bien son potencialmente alérgicos, de una forma usual, éstos requieren un equilibrio de proteínas específicos, en una matriz de proteínas derivadas de la leche. La presencia de tales tipos de múltiples nutrientes, pueden potenciar el efecto de los alérgenos de los alimentos. En tales tipos de matrices complejas, los alérgenos de los alimentos, de poca importancia, los cuales no son capaces de desencadenar una manifestación alérgica, por sí solos, pueden entonces convertirse en más potenciales, en el inicio de una reacción alérgica. Compuestos similares, los cuales pueden neutralizar los alérgenos, o actuar en la prevención alérgica, pueden ver disminuido o aniquilado su efecto, en tales tipos de matrices nutricionales complejas. De una forma específica, no es predecible, el hecho de si los compuestos usualmente reconocidos como actuando sobre la prevención de la alergia, se encontrarán todavía activos, y en qué extensión, en las matrices complejas, tales como las consistentes en una composición nutricional, para los lactantes y los niños de corta edad.

Así, por lo tanto existe una necesidad en cuanto al hecho de poder proporcionar ayuda, en los síntomas de las alergias, en poblaciones de los lactantes y de los niños pequeños, los cuales tienen una historia de episodios alérgicos y / o que son alérgicos.

5 Existe una necesidad en cuanto al hecho de poder proporcionar una composición nutritiva, completa, la cual no únicamente aporte a una variedad de nutrientes sino que, así mismo, reduzca, también, la gravedad de las reacciones alérgicas.

10 Existe una necesidad en cuanto al hecho de poder proporcionar una composición nutritiva, la cual modele la reacción alérgica en los pacientes jóvenes que sufren de una formas moderadas de alergias, ya que dichos pacientes, tienen una necesidades especiales, las cuales vienen dictadas por la incompleta madurez de sus sistemas intestinal e inmune.

15 Existe así mismo, también, una necesidad, en cuanto al hecho de poder modular reacciones alérgicas, en lo niños pequeños, los cuales no toleran la moléculas farmacéuticas astringentes, tales como por ejemplo, las correspondientes a las invenciones nutricionales, tales como las consistentes en la introducción de moduladores del sistema inmune, en el régimen nutricional regular.

20 Existe una necesidad en cuanto al hecho de poder proporcionar una composición nutritiva, la cual module la reacción alérgica de los jóvenes pacientes, en momento del destete, y en el período cercano a éste (es decir ya sea durante, cercanamente antes o cercanamente después del destete), cuando el tracto intestinal, experimenta una modificación substancial, y cuando se introducen nuevos alimentos sólidos, los cuales contienen, de una forma potencial, nueva proteínas alérgicas y, así, de este modo, el paciente, se particularmente a la sensibilización a los alérgenos de los productos alimenticios.

25 Existe una necesidad en cuanto al hecho de poder proporcionar una composición nutritiva, con objeto de ayudar en un mejor gobierno y control de los síntomas de las alergia respiratoria, o en la reducción de éstos (a saber, o en la reducción de la alergias aéreas), en los niños, y en los adultos, al exponerse a los alérgenos estacionales (tales como, por ejemplo, el polen), o a los alérgenos perennes (tales como, por ejemplo, los ácaros presentes en la materia en polvo casera, las cucarachas, la caspa de los animales domésticos, los mohos y los hongos),

30 Existe una necesidad, en cuanto al hecho de poder proporcionar una composición nutritiva, completa, la cual pueda restaurar el equilibrio del sistema inmune, en los pacientes alérgicos y, así, de este modo ser efectivos en la modulación de diferentes síntomas de las alergias (alergias cutáneas, alergias alimenticias, alergias respiratorias), de una forma especial, en pacientes con un sistema inmune reducido, o bien en pacientes de mayores o de avanzada edad.

35 Existe una necesidad, en cuanto al hecho de poder aliviar los síntomas de las alergias, procediendo a proporcionar una composición que sea efectiva, posiblemente, mediante la reducción de la exposición de los alérgenos intactos, incluso a pesar del hecho de que, la composición, pueda no reducir, directamente, la sensibilización a los alérgenos.

40 Existe una necesidad, en cuanto al hecho de poder disponer de una composición, la cual tenga un efecto positivo en la prevención secundaria de la alergia, al mismo tiempo que no actuar, necesariamente, sobre la prevención primaria a las mias alergias.

45 Existe finalmente una necesidad, en cuanto al hecho de poder disponer de una composición, de una forma más particular, la cual sea apropiada por los jóvenes pacientes, la cual, mediante la reducción de los síntomas, pueda actuar en disminución del "fenotipo alérgico" y, así, de este modo, pueda disminuir la sensibilización posterior, durante el transcurso de la vida, a nuevos alérgenos. Existe una necesidad, en cuanto al hecho de poder atenuar la marcha atópica.

#### 50 Resumen de la invención

55 En un primer aspecto, la presente invención, proporciona una composición nutritiva completa, para reducir los síntomas de las alergias las cuales se originan, de una forma particular, en los alimentos, en pacientes que tienen alergias desencadenadas por alérgenos de los alimentos u otros alérgenos, de una forma especial, en jóvenes pacientes o niños, en bebés y en lactantes, y que es especialmente efectivo, en el momento del destete, en donde, la composición, fomenta, de una forma significativa, , la prevención secundaria de las reacciones alérgicas desencadenadas por los alimentos, de una forma opcional, no afectando a la prevención primaria contra los mismo alérgenos.

60 En un tercer aspecto, la presente invención, proporciona una composición la cual comprende probióticos, los cuales pertenecen, de forma especial, al género Lactococcus.

En otro aspecto de la invención, la composición de la invención, es efectiva en la reducción de los síntomas alérgicos, a los alérgenos aéreos, en niños y en adultos.

5 La invención, puede proporcionar una composición la cual restaura el equilibrio inmune, en individuos alérgicos y, así, de este modo, ésta puede se efectiva para diferentes tipos de alergia.

La invención, puede tener el particular beneficio de la reducción de las alergias, posteriormente, durante el transcurso de la vida.

10 Descripción resumida de los dibujos

Figura 1 / Tabla 1 : Perfil de la citocina del PBMC humano Th2-sesgado, después del cultivo *Lactococcus lactis* NCC 2287 (SL131) depositado por la firma Nestec S.A. con la identificación CNCM I-4154, *Lactococcus lactis* NCC 2180 (SL60) CNCM I-4199 ó *Lactobacillus plantarum* NCC 1107 (Lp8) CNCM I-4227. Las células mononucleares de la sangre periférica, humana, se sesgaron hacia Th2, con IL-4 y anticuerpo anti-CD40, durante un transcurso de tiempo de 3 días y, a continuación, se procedió a añadir cepas bacterianas. Se procedió a recolectar los sobrenadantes, en el día 5, y se midieron las citocinas, mediante un ensayo del tipo ELISA.

15

Figura 2 / Tabla 2 : perfil del mRNA, del PBMC humano sesgado hacia Th2, después de un precultivo con *L. lactis* NCC 2287 (SL131). Las células mononucleares de la sangre periférica, humana, se sesgaron hacia Th2, con IL-4 y anticuerpo anti-CD40, durante un transcurso de tiempo de 3 días y, a continuación, se procedió a añadir *L.lactis* NCC 2287 (SL131). Las células, se recolectaron, durante un transcurso de tiempo de 10 horas y, 24 horas después, se procedió a medir los niveles de expresión del mRNA, con qRT-PCR.

20

Figura 3 : Descripción esquemática del modelo del ratón con alergia alimentaria a la OVA.

25

Figura 4 : Síntomas reducidos de la alergia alimentaria en los ratones los cuales reciben  $5 \times 10^8$  UFC / ml de *L. lactis* NCC 2287 (SL131) ó de *L. plantarum* NCC 1107 (Lp8), bien ya sea durante el período de sensibilización (primaria), o bien ya sea durante la última semana antes del reto del alérgeno (secundaria). Resultados de dos experimentos independientes.

30

Figura 5: Niveles medios de la Proteasa 1 de los Mastocitos del Ratón (MMCP-1) en suero, después de 4 horas del reto experimental.

35

Figura 6 / Tabla 3 : Producción de citocinas, mediante linfocitos y esplenocitos LN mesentéricos, estimulados *ex vivo*.

40

Figura 7 / Tabla 4: Niveles de expresión genética en el íleon, aislados, 4 horas después del reto experimental.

45

Figura 8: Producción de citocinas, mediante Células Mononucleares de la Sangre Periférica (PBMC's), a partir de individuos alérgicos al polen de la hierba, en medio, o en presencia de extracto de polen de alérgeno de la hierba (ALK – Abello wäsrig 6 grass). Después de un transcurso de tiempo de 2 días de cultivo, se procedió a añadir NCC 2287 (SL131), a razón de  $10^7$  UFC / ml. Se continuó con el cultivo de PBMC, durante un transcurso de tiempo adicional de 3 días, dando como resultado una duración total de cultivo de 5 días.

50

Figura 9 : Producción de citocinas, mediante células de sangre entera, procedentes de ambos tipos de individuos, individuos alérgicos al polen de la hierba, o individuos no alérgicos al polen de la hierba, con o sin NCC 2287 (SL131), a una tasa de  $10^7$  CFU/ml, en cultivo, durante un transcurso de tiempo de 5 días.

50 Descripción detallada de la invención

Definiciones : En esta especificación, los términos que se facilitan a continuación, tienen los siguientes significados:

55 “Pacientes”, significa a mamíferos, incluyendo a los humanos y a los animales, de una forma especial, a los animales de compañía o mascotas tales como los consistentes en los gatos y los perros. El término pacientes, incluye a los bebés o lactantes, a los niños, a los quinceañeros, a los sujetos frágiles, a los sujetos con una inmunidad reducida y / o a la población o animales mayores o de avanzada edad, en las etapas correspondientes de la vida.

60 “Composición nutritiva completa” Para los propósitos de este documento, una composición nutritiva (o nutricional) completa, es una composición, la cual comprende una cantidad significativa, siendo ésta, de una forma usual, de un porcentaje del 20 %, o más, de los nutrientes fundamentales recomendados para una edad dada. Tales tipos de nutrientes fundamentales, se proporcionan, de una forma usual, en una cantidad y una proporción tal, como para que éstas cubran un porcentaje del 20 %, ó más, de las dosis de nutrientes específicos recomendadas, para una edad dada, cuando se utilizan en una cantidad apropiada, como para proporcionar la ingesta calórica recomendada,

65

para una edad dada. Una composición nutritiva completa, comprende, de una forma usual, una fuente de proteínas, una fuente de lípidos, una fuente de hidratos de carbono, en una proporción equilibrada, la cual cumpla con la recomendación general, para una edad dada. Esta incluye, así mismo, también, de una forma usual, los micronutrientes tales como los consistentes en las vitaminas y los minerales, así como, también, una fuente de los aminoácidos esenciales, y una fuente de los ácidos grasos esenciales. Se entenderá, no obstante, el hecho de que, una composición nutritiva completa, puede no comprender todos los nutrientes específicos, y puede no comprender todas las cantidades recomendadas, los cuales son necesarios para cumplir con todas las necesidades nutricionales de un bebé o lactante, o de un niño pequeño. Una composición nutritiva completa, excluye a las composiciones que comprendan, únicamente, los *Lactococcus* ó los *Lactococcus*, en una proporción predominante.

“Síntomas de alergias”, incluyen, de una forma general, a los síntomas desencadenados por los alérgenos. Tales tipos de síntomas, incluyen a los síntomas cutáneos (el enrojecimiento de la piel, las erupciones, el picor o purito, la dermatitis, el eczema), a los síntomas oculares (el picor y los ojos llorosos), a los síntomas gastrointestinales (la congestión, el dolor abdominal, los calambres, los vómitos y la diarrea), y a los síntomas respiratorios (el prurito o picor en la nariz, la congestión nasal, la rinitis, el asma), y en los casos graves, a manifestaciones sistémicas (vértigos o mareos, confusión mental, anafilaxis).

“Prevención primaria de alergias”, significa todas las medidas encaminadas a evitar o a reducir la sensibilización (inmunológica) alérgica, tal como, por ejemplo, la prevención o reducción de los anticuerpos IgE específicos.

“Prevención secundaria de alergias”, significa la prevención o reducción del desarrollo de enfermedades alérgicas / síntomas alérgicos, en un individuo sensibilizado.

“Período de destete”, es el período durante el cual, los lactantes o bebés, se adaptan, desde una nutrición líquida, a los alimentos sólidos o semi-sólidos, y se adaptan desde un tipo de alimento casi único, (generalmente, la leche materna, o una fórmula para lactantes o bebés), a una variedad de alimentos.

“Sensibilización”, significa la inducción / desarrollo de anticuerpos IgE alérgeno-específicos.

“Estimulación inmune”, puede caracterizarse por un incremento de las citocinas Th-1, principalmente, la IFN $\gamma$ , la cual es necesaria para la defensa contra las exposiciones microbianas dañinas, de una forma particular, en individuos con un sistema inmune reducido, sin un incremento simultáneo de las citocinas inhibitorias, tales como la IL-10.

“Probiótico”, significa preparaciones o compuestos celulares microbianos 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", – Probióticos: cómo pueden definirse éstos -, Trends Food Sci. Technol. 1999 : 10, 107 - 10). La definición de un probiótico, puede comprender una única cepa de microorganismos, una mezcla de varias cepas y / o una mezcla de varias especies géneros de bacterias. En los casos de mezclas, el término singular “probiótico”, puede también utilizarse, todavía, para designar la mezcla o preparación probiótica. Para los propósitos de la presente invención, los microorganismos del género *Lactococcus*, se consideran como probióticos.

“Prebiótico, significa, de una forma general, un ingrediente alimenticio no digestible, el cual afecta de una forma beneficiosa, al huésped, procediendo a estimular, de una forma selectiva, el crecimiento y / o la actividad de los microorganismos presentes en el intestino del huésped, e intentando así, de este modo, la mejora de la salud del huésped.

“Alergias aéreas”, y “alérgenos aéreos”, se utilizan como sinónimos de alérgenos respiratorios y alergias respiratorias.

“Alergias respiratorias o alergias de la piel”, son alergias, cuyos síntomas, afectan a la piel o cutis, o cuyos modos de acción, involucra a la piel o cutis. Éstos pueden incluir al enrojecimiento de la piel o eritema, a la erupción cutánea, o a la irritación de la piel.

La cepa de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) NCC 2287 (Nestlé Culture collection - [Colección de Cultivos de la firma Nestlé] -) es la cepa de *L. lactis*, la cual tiene el nombre alternativo de SL131 y la referencia de identificación internacional CNCM-I-4154 (Collection Nationale de Cultures de Microorganismos at Institute Pasteur – [Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos en el Instituto Pasteur] - ), París, Francia. Cepa de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) NCC 2180 (Nestlé Culture collection), es la cepa de *L. lactis*, con el nombre alternativo de SL60 y la referencia de identificación internacional CNCM-I-4199. La cepa de *Lactobacillus plantarum* NCC 1107 (Nestlé Culture Collection), es la cepa de *L. plantarum*, con el nombre alternativo de Lp8 y con la referencia de identificación internacional CNCM I-4227. Las identificaciones CNCM, se refieren a la “Collection Nationale de Cultures de Microorganismes at Institut Pasteur”, 22 rue du docteur Roux, 75724 París, Francia.

Los inventores, han evidenciado el hecho de que, las reacción y los síntomas alérgicos, pueden aliviarse, cuando a los mamíferos jóvenes sensibilizados, se les provee con una composición nutritiva completa, la cual comprenda la cepa de *L. lactis* NCC 2287 (SL131). Esto definía un efecto positivo en la prevención secundaria de las alergias.

- 5 De una forma sorprendente, este efecto, no se acompañaba por una reducción de la sensibilización de los jóvenes mamíferos, a las alergias (a saber, no se evidenció ninguna prevención primaria de las alergias.

Efecto de la composición

- 10 La presente invención, se refiere al uso de microorganismos del género *Lactococcus*, de una forma más particular, a un cepa específica de *Lactococcus lactis*, y de una forma más específica, a la cepa NCC 2287 (SL131), para la fabricación de una composición nutritiva, completa, para reducir los síntomas, en pacientes que tengan alergias desencadenadas por alimentos, o por alérgenos aéreos o por alérgenos de la piel. Los inventores, han evidenciado el hecho de que, el consumo de *Lactococcus*, en general, y de *L. lactis* NCC 2287 (SL131), en particular, conduce a unos síntomas reducidos de la alergia alimentaria, en un grupo de ratones, los cuales reciben una composición nutritiva, la cual contiene la citada cepa de *Lactococcus*. Este hecho, se evidencia, cuando se induce una reacción alérgica (reto), después de la sensibilización. El modelo, imita la alergia alimentaria, en seres humanos, cuando los humanos (de una forma típica, lactantes / niños pequeños), se sensibilizan, de una forma natural, a los alérgenos de los alimentos, y se vuelven a exponer a los citados alérgenos. La cepa bacteriana *L. lactis* NCC 2287 (SL131), muestra así, de este modo, un efecto protector.

- 25 En una forma de presentación de la presente invención, el efecto de la composición es, de una forma específica, un efecto sobre la prevención secundaria de las alergias. Las síntomas de las alergias, en el modelo del ratón, se reducen así, efectivamente, de una forma significativa, tal y como se ilustra, mediante una puntuación clínica, alérgica, menor. De una forma general, los síntomas, pueden incluir a la totalidad o a una selección de los síntomas usualmente reconocidos de las alergias.

- 30 En una forma de presentación de la invención, los síntomas, comprenden a la diarrea, a la irritación de la piel, a la inflamación del tracto intestinal, a la erupción cutánea o purito, a la irritación de la piel, a los síntomas oculares, a los síntomas respiratorios, o a una combinación de éstos.

- En una forma de presentación de la invención, los síntomas, vienen acompañados por una liberación de los mediadores bioquímicos, tales como los consistentes en la tripsasa, la quimasa, la histamina, los leucotrienos.

- 35 En una forma de presentación de la presente invención, la composición, no obstante, no tienen ningún efecto en la sensibilización de los pacientes a los alérgenos. De hecho, la prevención primaria, parece no haberse logrado, mediante la composición la cual comprendía la cepa de *L. lactis* NCC 2287 (SL131). Los sujetos, se encuentran todavía sensibilizados a los alérgenos alimentarios, pero, éstos, desarrollan menos síntomas de alergia, cuando se vuelven a exponer a los alérgenos sensibilizantes. Sin pretender ligarlo a ninguna teoría, se cree que, el efecto, por lo tanto, no reduce las defensas inmunes naturales (las cuales tengan un efecto positivo para los pacientes), sino que, simplemente, reduce la expresión de los síntomas de la alergia.

- 45 En una forma de presentación de la presente invención, la composición, influye, de una forma significativa, sobre la respuesta inmune desencadenada por la exposición a los alérgenos aéreos. Como respuesta a la estimulación mediante la cepa de *L. lactis* NCC 2287 (SL131), las PBMC's (Células Mononucleares de la Sangre Periférica), y las células de sangre entera de individuos alérgicos al polen de la hierba, secretaron una cantidades incrementadas de citocinas (IFN $\gamma$  e IL - 10), las cuales son sugestivas de la restauración del equilibrio inmune en los individuos alérgicos. La composición, tiene el valor añadido consistente en ser efectiva para diferentes trastornos alérgicos desencadenados por una amplia variedad de alérgenos (alimentarios, aéreos, cutáneos).

- 50 En una forma de presentación, la composición de la presente invención, comprende la cepa de *L. lactis* NCC 2287 (SL131), y tiene un efecto efectivo en la reducción de los síntomas de la alergia, de una forma especial, en pacientes que sufren de alergias alimentarias, alergias de la piel, o alergias aéreas.

- 55 En una forma de presentación, la composición de la presente invención, reduce la sensibilización a otros alérgenos, posteriormente, durante el transcurso de la vida. Se cree que, la composición, fomenta (o por lo menos, no bloquea), los procesos naturales de la maduración - del sistema - inmune, y así, de este modo, ésta es capaz de tener un efecto a largo plazo, en la reducción de la sensibilización de los mismos alérgenos, o a diferentes alérgenos (reducción de la sensibilización, posteriormente, a lo largo de la vida). Solamente mediante la reducción de los síntomas de la alergia (prevención secundaria), se hipotetiza sobre el hecho consistente en que, la composición de la presente invención, puede permitir que acontezca la maduración natural inmune, y tener así, de este modo, tal tipo de efecto beneficioso de larga duración y largo plazo.

- 65 En una forma de presentación de la presente invención, la composición, inhibe las respuestas a los desencadenantes alérgicos, en diferentes especies de mamíferos. La composición, puede utilizarse para reducir los

síntomas, en especies tales como las consistentes en los gatos y en los perros, los cuales, según se conoce, desarrollan reacciones alérgicas.

5 En una forma de presentación de la presente invención, la composición, inhibe las respuestas inmunes alérgicas, y de una forma simultánea, incrementa los niveles de las respuestas inmunes que son necesarias para luchar contra los microbios dañinos. La composición, puede así, de este modo, ser efectiva en el incremento de la función inmune, en los sujetos frágiles, en los sujetos mayores o de avanzada edad, y en los sujetos hospitalizados.

10 Composición de la invención o para su uso en la invención:

10 La composición de la presente invención, es una composición nutritiva, completa, tal como la consistente en una fórmula para lactantes o bebés, o ésta puede aportar una porción substancial de la dieta completa. De una forma preferible, la composición, es una composición nutritiva, completa, la cual aporta la totalidad o casi la totalidad de los requerimientos nutritivos, del cuerpo objetivado como diana, cuando ésta se toma como la únicamente fuente de nutrientes. En otra forma de presentación, tal como la consistente en un producto alimenticio para bebés, la composición, aporta una porción de la dieta completa, correspondiendo dicha porción, de una forma preferible, a un porcentaje del 50 %, o más, o a un porcentaje del 20 %, o más (cuantitativamente o cualitativamente). En una forma de presentación, la composición, comprende cereales para lactantes o bebés. En una forma de presentación, la composición, puede ser una composición líquida, para niños, la cual comprende cereales, o un producto alimenticio para bebés. En una forma de presentación, la composición, comprende productos lácteos (en forma de materia en polvo, o en forma líquida), para niños y para adultos. En una forma de presentación, la composición, comprende productos para el cuidado de los animales de compañía o mascotas / productos nutritivos para los animales de compañía o mascotas (alimentos deshidratados o desecados y húmedos, productos tópicos), para los animales domésticos.

25 El probiótico utilizado, es el probiótico del género *Lactococcus*. Se bien los inventores no pueden excluir el hecho de que, otros probióticos, podrían tener un efecto similar, o un efecto relacionado, ningún dato experimental, puede haber podido probar el hecho de que, otros géneros o cepas de probióticos, son igualmente efectivos, aparte del que se ha observado para el *B. longum*, de una forma particular, la cepa de *B. longum* NCC 2705, la cual se encuentra descrita en la solicitud de patente co-pendiente, por parte de los mismos inventores.

30 En una forma de presentación de la presente invención, el probiótico, es la cepa de *L. lactis* NCC 2287 (SL131). En una forma de presentación de la presente invención, la cepa, es la *L. lactis* NCC 2180 (SL60).

35 En una forma de presentación de la presente invención, la composición, comprende una cantidad comprendida dentro de unos márgenes situados entre  $10^4$  y  $10^{11}$  de unidades de formación de colonias (UFC – [también, CFU – del inglés colony forming units ] -) por g de composición seca. Cuando la formulación, se trata de una fórmula para lactantes o bebés, la cantidad de probiótico en la fórmula para lactantes o bebés, puede ser la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre  $10^5$  UFC / g y  $10^8$  UFC / g, de la fórmula para lactantes o bebés. En una forma de presentación, la composición, comprende una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre  $10^6$  UFC / g y  $5 \times 10^7$  UFC / g, es decir, en una dosis la cual se ha demostrado que tiene un efecto fisiológico. En una forma de presentación, se ha identificado el hecho consistente en que, los probióticos, a una reducida dosis, pueden tener un efecto beneficioso, de una forma particular, cuando la composición, comprende también probióticos y proteínas, en una cantidad limitada definida. En una forma de presentación de este tipo, los probióticos, se encuentran presentes, en la composición, en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre  $10^3$  UFC / g y  $10^5$  UFC / g. Los prebióticos, en el caso de los oligosacáridos y / o las proteínas, pueden encontrarse presentes en una cantidad correspondiente a un valor que no exceda de los 4 g / 100 kcal, o inferior a los 2 g / 100 kcal, o inferior a los 1,8 g / kcal, o inferior a los 1,5 g / 100 kcal de la composición.

50 El probiótico, puede mezclarse conjuntamente con la composición, seca o húmeda, de la presente invención. Pueden aplicarse tratamientos o procesos específicos, con objeto de mejorar la estabilidad o la viabilidad de los probióticos, en la composición. El probiótico, puede aplicarse en una forma seca, o bien éste puede aplicarse en una forma húmeda. Después de haber procedido a mezclar el probiótico con la composición, la mezcla, puede procesarse, de una tal forma que no se afecte, de una forma dramática, a la viabilidad de los probióticos. En otra forma de presentación, los probióticos, se inactivan parcialmente o totalmente, antes, durante, o después del proceso de mezclado. En una forma de presentación, los probióticos, se ha procedido a convertir a los probióticos en inactivos y / o incapaces de replicarse, previamente a su uso, en la composición de la presente invención. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante un tratamiento de calor, o mediante otros tratamientos descritos.

60 En una forma de presentación, el probiótico, está muerto o no se está replicando, o éste se ha inactivado, de tal forma que se convierta a éste en no replicable. El término probiótico, comprende, también, el significado de "partes o fragmentos de bacterias prebióticas".

En una forma de presentación de la presente invención, la composición, comprende prebióticos. Se conoce el hecho de que, los prebióticos, comprenden hidratos de carbono y, de una forma más específica, éstos comprenden oligosacáridos. De una forma adicional, se conoce el hecho de que, éstos, se han venido utilizando ampliamente, como ingredientes alimenticios funcionales. Éstos resisten a la hidrólisis, mediante las enzimas de tracto digestivo, pueden alcanzar el colon, de una forma no degradada, y proporcionar una substancia de hidratos de carbono, la cual es particularmente apropiada para el crecimiento de las bifidobacterias o de otros probióticos. Los oligosacáridos, pueden producirse, por ejemplo, a partir de la glucosa, la galactosa, la xilosa, la maltosa, la sucrosa (sacarosa), la lactosa, el almidón, el xilano, la hemicelulosa, la inulina, o una mezcla de entre éstos. Los productos prebióticos, purificados, comercialmente disponibles en el mercado, tales como los consistentes en los fructooligosacáridos, contienen una cantidad de sólidos superior a un porcentaje de aprox. un 95%, en forma de oligosacáridos.

De una forma preferible, una forma de presentación de la composición, es una composición nutritiva, la cual comprende por lo menos un prebiótico.

De una forma preferible, una forma de presentación del prebiótico, comprende un oligosacáridos producido a partir de la glucosa, la galactosa, la xilosa, la maltosa, la sucrosa (sacarosa), la lactosa, el almidón, el xilano, la hemicelulosa, la inulina, o una mezcla de entre éstos. De una forma más preferible, el prebiótico, comprende una mezcla de fructooligosacárido e inulina. De forma preferible, esta mezcla, comprende PREBIO1®, ó una mezcla comercialmente disponible en el mercado, de RAFTILOSE® y RAFTILINE®.

De una forma preferible, una forma de presentación del componente prebiótico de la composición, comprende un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 50 % hasta aprox. un 90 %, de fructooligosacárido. De una forma más preferible, ésta comprende un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 60 % hasta aprox. un 80 %, de fructooligosacárido. De una forma mayormente preferible, ésta comprende un porcentaje de aprox. un 70 %, de fructooligosacárido. De una forma preferible, una forma de presentación del prebiótico, comprende un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 10 % hasta aprox. un 50 %, de inulina. De una forma más preferible, ésta comprende un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 20 % hasta aprox. un 40 %, de inulina. De una forma mayormente preferible, ésta comprende un porcentaje de de aprox. un 30 % de inulina. En una forma de presentación, el componente prebiótico, puede representar un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,1 % hasta un 10 % de la composición.

En una forma de presentación, la composición de la presente invención, comprende, de una forma adicional, un extracto de manzana, el cual comprende polifenoles. El extracto de manzana, puede ayudar a reducir los síntomas de las alergias originadas a partir de los alimentos, en pacientes que tienen alergias desencadenadas por alérgenos de los alimentos. Como tal, el extracto de manzana, actúa como un forma sinérgica, con el probiótico *Lactococcus*, con objeto de modular, de reducir, o de atenuar alergias, en pacientes que tienen alergias alimentarias. En una forma de presentación, tal tipo de composición, se utiliza para productos alimenticios para bebés y / o para cereales para bebés, los cuales representan, de una forma natural, un portador o soporte apropiado para la composición. En una forma adicional de presentación, el producto alimenticio para bebés o cereales para bebés, comprende extractos de manzana, o material procedente de la manzana. En una forma de presentación de la presente invención, el extracto de manzana, es el extracto de proteínas, comercializado en el mercado por parte de la firma Val de Vire Bioactives (Conde sur Vire, Francia, bajo la referencia comercial de "Pomactiv HFV". En una forma de presentación, el extracto de manzana, es similar al anteriormente citado Pomactiv HFV, o se deriva de éste, y tiene un efecto similar. En una forma de presentación, el uso del extracto de manzana, de una forma especial, con L. Lactis, es de un interés particular, para otros niños distintos a los lactantes o niños pequeños, los quinceañeros, los adultos, o los animales tales como los gatos y los perros, en la correspondiente fase de edad.

Mecanismo hipotético de acción

Las enfermedades alérgicas, se han venido incrementado de una forma ininterrumpida, durante el transcurso de las pasadas décadas, y éstas se consideran, de una forma usual, como epidemias, por parte de la WHO la VHO (Organización Mundial de la salud). De una forma general, la alergia, se considera como siendo el resultado procedente de un inequilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 del sistema inmune, conduciendo a un fuerte sesgo o tendencia hacia la producción de mediadores de Th2. Así, por lo tanto, sin intentar ligarlo a ninguna teoría, se hipotetiza sobre el hecho de que, la alergia, puede mitigarse, regularse hacia abajo, o prevenirse, mediante la restauración de un equilibrio apropiado entre los brazos Th1 y Th2 del sistema inmune. Esto, implica la necesidad de reducir las respuestas TH2, o de intensificar, por lo menos de una forma transitoria, las respuestas Th1. La primera, podría caracterizarse por el hecho consistente en la producción reducida de las citocinas Th2, tales como la IL-5, y la última, podría caracterizarse por el hecho de una producción incrementada de citocinas Th1, tales como el IFN $\gamma$ .

En una forma de presentación de la presente invención, la composición, comprende proteínas hidrolizadas o parcialmente hidrolizadas. Una composición nutritiva basada en proteínas (parcialmente) hidrolizadas, es particularmente apropiada para el sistema inmune y el tracto gastrointestinal de los lactantes o bebés / niños jóvenes, debido al hecho de que, las proteínas hidrolizadas, se digieren de una forma más fácil, y tienen una

reducida alergenicidad, si éstas se comparan a las proteínas intactas. De una forma adicional y sin pretender ligarlo a ninguna teoría, puede hipotetizarse sobre el hecho de que, las proteínas hidrolizadas, podrían ser un sustrato preferible para los probióticos, y las bacterias intestinales (de una forma especial, aquéllas que exhiben una variedad de actividades peptidasa), al compararse con las proteínas intactas, conduciendo a un efecto mejorado de la cepa probiótica, y así, de este modo, un sinergismo entre las proteínas hidrolizadas los probióticos. Esto representa una composición la cual es la más apropiada para el sistema inmune y el tracto gastrointestinal de una lactante o bebé / niño joven o pequeños, alérgico a los alimentos. En este caso, es de la mayor relevancia, para la invención, la combinación de *L. lactis* NCC 2287(SL131), con proteínas hidrolizadas.

En una forma de presentación, las proteínas hidrolizadas, son proteínas hidrolizadas procedentes del suero láctico y / o la caseína. En una forma de presentación, las proteínas hidrolizadas, resultan de la acción de la tripsina y / o la quimotripsina en las proteínas (de una forma especial, de las proteínas de suero láctico). En una forma de presentación, las proteínas hidrolizadas, comprenden proteínas de soja y / o proteínas de huevo. En una forma de presentación, las proteínas hidrolizadas, resultan de la acción de las proteasas tales como las consistentes en los productos comerciales Protamex® y / o Flavourzyme® (de la firma Novozyme, Dinamarca). En una forma de presentación, las proteínas de la composición, de una forma preferible, las proteínas hidrolizadas, comprenden proteínas de cereales o de huevos. En una forma de presentación, las proteínas hidrolizadas, resultan de la acción de la Alcalasa. La composición de la invención, puede comprender una mezcla de 2 ó más de las fuentes de proteína citadas.

Grupo objetivizado como diana

La composición de la invención, se objetiviza, de una forma apropiada, para diferentes categorías de pacientes: Éstos incluyen tanto a los pacientes relativamente jóvenes, los cuales desarrollan los síntomas de los alérgenos alimentarios, como a los pacientes jóvenes y adultos, los cuales tienen manifestaciones alérgicas a los alérgenos aéreos o a los alérgenos de contacto. Otras especies de mamíferos, (de una forma especial, mamíferos no humanos, o animales domésticos, tales como los gatos, los perros o los caballos, pero, que pueden también incluir a los conejos, los conejillos de India, los hámsters, los ratones, los cochinitos, los leones, los tigres o las ratas), los cuales reaccionan con alérgenos similares, podrían también beneficiarse de esta composición. De una forma preferente, para las alergias alimentarias, los pacientes, son lo suficientemente jóvenes, como para encontrarse todavía en una fase de maduración de su sistema inmune y de su tracto gastrointestinal. En dichos pacientes, el efecto de la composición, puede ser más efectivo o más rápido. En una forma de presentación, la composición, es una fórmula para lactantes o bebés, un producto de cereales para lactantes o bebés y / o un producto alimenticio para infantes o bebés. De una forma preferible, la composición, está objetivizada para humanos jóvenes de una edad inferior a los 6 años, entre el nacimiento y la edad de 3 años, o entre el nacimiento y el destete. En una forma de presentación, la composición, es una fórmula de iniciación, o una fórmula de seguimiento, para lactantes o bebés. De una forma preferible, la composición, comprende una amplia mayoría de los nutrientes necesario para la alimentación de los jóvenes humanos.

En una forma de presentación de la composición nutritiva, la composición, es una composición de cereales para lactantes o bebés / niños pequeños de entre 1 y 4 años de edad. La composición, puede objetivarse de una forma más específica, para el período de destete / o hasta una edad de 12 meses, y administrarse durante dicho período de destete / o hasta una edad de 12 meses. El período de destete, es realmente importante, en vistas de la invención, ya que, los lactantes o bebés, se encuentran expuestos a una variedad de productos alimenticios, durante el período de destete, mientras que, al mismo tiempo, experimentan todavía una maduración y una reorganización de su sistema inmune y de su tracto gastrointestinal. El control efectivo de la respuesta alérgica, es por lo tanto de una importancia particular, durante dicho período.

En vistas al uso de la composición de la presente invención, los niños, los bebés o los lactantes, pueden ser niños alérgicos. Los niños alérgicos, son aquellos niños, bebés o lactantes, los cuales hayan experimentado por lo menos un episodio de reacción alérgica, - bien ya sea ligera, bien ya sea moderada, o bien ya sea grave -, a los alérgenos de los alimentos. En una forma de presentación de la presente invención, los niños, bebés o lactantes, han declarado o evidenciado graves alergias a los alérgenos de los alimentos y / o éstos han experimentado más de un episodio moderado o grave, de alergia alimentaria. Los síntomas de las alergias, pueden incluir a varios síntomas tales como los consistentes en la irritación cutánea o eritema (enrojecimiento de la piel), los síntomas gastrointestinales o los síntomas respiratorios.

Los alérgenos de alimentarios abarcados por la presente invención, pueden incluir todos los tipos de alérgenos de origen natural, o que se originan de una forma usual, en los alimentos, de una forma especial, en los productos alimenticios para los humanos jóvenes (tales como, por ejemplo, los lactantes, los bebés, los niños). En otra forma de presentación, los alérgenos alimentarios, se encuentran, mayormente, en los alimentos para los niños mayores, para los quinceañeros y para los adultos.

En una forma de presentación, la composición nutricional, es una composición para niños y para adultos, los cuales sufren de alergias respiratorias. Los alérgenos respiratorios abarcados por la presente invención, pueden incluir a

5 todos los tipos de alérgenos, los cuales consistan en los alérgenos aéreos, los cuales pueden ser estacionales (tales como, por ejemplo, el polen) o que pueden ser perennes (tales como los consistentes en los ácaros presentes en la materia en polvo casera, las cucarachas, la caspa de los animales domésticos, los mohos y los hongos). Se entenderá el hecho de que, los bebés o lactantes, pueden ser particularmente sensibles a los alérgenos aéreos, - bien ya sea mediante un efecto inmediato, o bien ya sea mediante un efecto posterior durante el transcurso de la vida (mediante la "educación" de sistema inmune).

10 En una forma de presentación, la composición nutricional, es una composición para otras especies de mamíferos, distintos a los humanos. Tales tipos de animales, pueden incluir a los gatos, a los perros, y a los caballos, y éstos pueden también incluir a los conejos, a los conejillos de indias, a los hámsters, a los ratones, a los cochinitos, a los leones, a los tigres, o a las ratas. Estos tipos de animales, pueden desarrollar diferentes manifestaciones de los síntomas alérgicos.

15 En una forma de presentación, la composición nutricional, es una composición para proporcionar un incremento de la función inmune, en los adultos frágiles, en los adultos hospitalizados, y en los en los adultos mayores o de avanzada edad, los cuales tengan un estatus inmune reducido.

20 En una forma de presentación, la composición de la presente invención, es una composición nutricional, para pacientes adultos, para los pacientes mayores o de avanzada edad, o para los pacientes frágiles. De una forma preferible, en un ejemplo, la composición, es una composición nutricional, la cual tiene un perfil completo de aminoácidos, de hidratos de carbono, de lípidos, y de micronutrientes (tales como los consistentes en las vitaminas), de tal forma que, éste, sea suficiente como para cumplir con las necesidades calóricas y nutritivas, de los pacientes frágiles. En una forma de presentación, la composición, es una composición entérica, para la alimentación mediante tubo sonda, en pacientes los cuales no absorben alimentos sólidos.

25 Resultados experimentales, Sección 1:

30 Se procedió a someter a tests de ensayo los probióticos, de una forma predominante, los pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en ensayos de humanos y de animales, para valorar su capacidad para interferir con la sensibilización alérgica o con el desarrollo de los síntomas alérgicos, en individuos sensibilizados. Aquí, en este caso, pretendíamos abordar el hecho consistente en si, las bacterias del género *Lactococcus*, tenían un potencial para mitigar el desarrollo de la sensibilización o los síntomas alérgicos. De una forma específica, procedimos a someter a tests de ensayo, las características y los efectos de las *Lactococcus lactis* NCC 2287 (SL131) y *Lactococcus lactis* NCC 2180 (SL60).

35 En una etapa inicial, procedimos a desarrollar y a usar un sistema *in vitro*, basado en linfocitos de la sangre humana, con objeto de determinar los perfiles de citocina inducida por *Lactococcus*. Procedimos a hipotetizar sobre el hecho de que, los perfiles observados, serían predictivos para la producción de citocinas *in vivo*, mediante las mismas cepas y, así, de este modo, para los efectos biológicos conferidos por dichas cepas.

40 Las células de un individuo alérgico, o de un individuo propenso al desarrollo de una alergia, se caracterizan por su propensión a producir citocinas Th2. Con objeto de imitar parcialmente este estatus, *in vitro*, procedimos a desarrollar un modelo de cultivo de las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) humana segadas hacia Th2, como una alternativa a la utilización de PBMC, procedente de donantes alérgicos. El sesgado hacia Th2, se indujo procediendo a cultivar PBMC, con interleucina (IL)-4 + anticuerpo anti-CD40, de la forma que se encuentra detallada en la sección de Procedimientos. Como una lectura básica, las citocinas IFN $\gamma$ , IL- 10 e IL - 5, se leyeron mediante un ensayo ELISA, en el sobrenadante de las células estimuladas con las *Lactococcus*.

45 La figura 1 / Tabla 1, muestra el hecho de que, la *L. lactis* NCC 2287 (SL131), inducía fuertemente la secreción de IFN $\gamma$  e IL - 10, de una forma concomitante con la inhibición de la secreción de IL - 5. De una forma similar, la *L. lactis* NCC 2180 (SL60) inducía la producción de IFN $\gamma$  e IL - 10, y la inhibición de la secreción de la IL - 5. A efectos comparativos, otra cepa probiótica candidata, a saber, la *Lactobacillus plantarum* NCC 1107 (Lp8), inducía únicamente unos reducidos niveles de IFN $\gamma$  e IL - 10, pero era un buen inhibidor de la producción de la IL - 5.

50 La figura 2 / Tabla 2, muestra la confirmación de estos resultados, para la *L. lactis* NCC 2287 (SL131) sobre el nivel de mRNA. Se procedió a analizar los niveles de expresión de varios géneros, 10 horas y 24 horas después del inicio de los co-cultivos de PBMC humana TH2-segada, con *L. lactis* NCC 2287 (SL131), LPS ó sin estímulos.

55 El cultivo de PBMC TH2-segada, con *L. lactis* NCC 2287 (SL131), condujo a una fuerte inducción de mRNA de IFN $\gamma$  e IL - 10 (Figura 2). El pico de la expresión de mRNA, se alcanzó después de un transcurso de tiempo de 10 horas de co-cultivo, con *L. lactis* NCC 2287 (SL131). Siguiendo un perfil de expresión similar, se procedió a inducir mRNA para Tbet, un factor de transcripción regulador máster para las citocinas Th1, mediante *L. lactis* NCC 2287 (SL131). Se indujo un nivel medio-bajo de mRNA, mediante estimulación de LPS, en donde, los niveles de transcripción, en los cultivos (medios) no estimulados, fluctuaron únicamente de una forma marginal. Después de la estimulación con *L. lactis* NCC 2287 (SL131), la transcripción del mRNA de la IL - 5, se incrementó, durante un

reducido transcurso de tiempo, después de la iniciación del cultivo, antes de inhibirse fuertemente, y reducirse a unos niveles inferiores a los de la células Th2 (medio) no tratadas. Se notó un perfil de expresión de mRNA similar, para el GATA-3, un factor de transcripción regulador master para las citocinas Th2. La totalidad de estos descubrimientos, en su conjunto, confirman los resultados obtenidos en el nivel de proteínas (Fig. 1 / Tabla 1)

5 Se procedió a medir el efecto *in vivo* de la *L. Lactis* NCC 2287 (SL131), en un modelo de alergia alimentaria del ratón (OVA (OVA Food Allergy Mouse Model – [Modelo de la alergia alimentaria del ratón a la ovalbúmina ] -) -, el cual se ilustra en la Fig. 3).

10 Se procedió a sensibilizar ratones BALB/c, a intervalos semanales, con ovalbúmina (OVA) + la toxina de cólera, mediante la vía o ruta oral, durante un transcurso de tiempo de 7 semanas. En este modelo, el reto experimental oral con una amplia dosis de OVA, al final del período de sensibilización, conduce a unos síntomas clínicos, tales como los consistentes en la diarrea, los episodios de rascarse, el pelo erizado, la cianosis, y la pérdida de movilidad.

15 La *L. lactis* NCC 2287 (SL131) (5 x 10<sup>8</sup> UFC / ml; ad libitum), se administró, a los ratones, vía el agua corriente para beber, durante la fase de sensibilización, desde el día 1, hasta el día 45, ó el día 50 (prevención primaria), o durante la última semana de los experimentos (día 43 – 50; prevención secundaria).

20 La Figura 4, muestra los síntomas clínicos observados en dos experimentos individuales. Después del reto experimental, los ratones tratados *L. lactis* NCC 2287 (SL131), durante la última semana del experimento (prevención secundaria), desarrollaron unos síntomas clínicos menos graves, que los correspondientes a los animales sensibilizados y no tratados (Control Positivo). Los ratones los cuales consumieron *L. lactis* NCC 2287 (SL131), durante la fase de sensibilización del experimento (prevención primaria), no mostraron unos síntomas reducidos. En el experimento 1, se procedió a someter a test de ensayo la *L. plantarum* NCC 1107 (Lp8), de una forma paralela a la *L. lactis* NCC 2287 (SL131). Ni en la prevención primaria, ni tampoco en la prevención  
25 secundaria, esta cepa, no redujo los síntomas alérgicos, lo cual se correspondía con nuestra hipótesis *in vitro*.

30 Tal y como se muestra en la figura 5, adicionalmente a la clasificación (puntuación) clínica, se procedió a determinar los niveles en suero de la proteasa 1 de los mastocitos del ratón (MMCP-1 – [mouse mast-cell protease 1]-), como una medida de la activación de los mastocitos intestinales. El consumo de *L. lactis* NCC 2287 (SL131), en la prevención secundaria, redujeron los niveles en suero de la MMCP-1, en comparación con los niveles en suero de animales de control no tratados (Figura 5). El tratamiento con *L. lactis* NCC 2287 (SL131), en prevención primaria, no influyó en los niveles de suero de la MMCP-1.

35 La figura 6 / Tabla 3, muestra la producción de citocinas, en linfocitos reestimulados *ex vivo*. Para este propósito, se procedió a recolectar linfocitos procedentes de nódulos linfáticos mesentéricos (MLN)- [mesenteric lymph nodes]-, después del reto experimental, éstos se reestimularon con 1 mg / ml de OVA, y se cultivaron, durante un transcurso de tiempo de 72 horas. Se midieron los niveles de IL-1, IL-2, IL-4, KC, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-10, mediante un ensayo múltiple (Mesoscale®). Los linfocitos procedentes de los MLN de los ratones tratados con *L. lactis* NCC  
40 2287 (SL131), produjeron menos IL-4, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, en comparación con el Control Positivo (Tabla 3). De una forma similar, los esplenocitos, secretaron unos niveles reducidos de IL-2, IL-4, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5, e IL-10.

45 Se procedió a determinar los niveles de expresión en el intestino de varios genes asociados con la alergia, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, a tiempo real, cuantitativa (qRT-PCR- [véase el procedimiento, más abajo, a continuación] -). Las mediciones de expresión de los genes, se llevaron a cabo en tejidos procedentes del íleon, para el grupo de control positivo, para el grupo de control negativo, y para el grupo que recibió la *L. lactis* NCC 2287 (SL131), durante la última semana antes del reto experimental (prevención secundaria). La Figura 7 / Tabla 4, ilustra los resultados obtenidos: El grupo que había recibido la *L. lactis* NCC 2287 (SL131), exhibía una expresión reducida de varios genes, incluyendo a las citocinas interleucina (IL)-13, IL-10, interferón (IFN)- $\gamma$ , chemocina CCL11 (eotaxina) en las placas de Peyer del íleon y la citocinas IL-13, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , chemocinas CCL11 (eotaxina) y  
50 CCL17 (TARC) en el íleon. Se observó un marcado incremento del receptor de chemocina CCR3. Los genes para los cuales se evidenció un expresión reducida, son marcadores reconocidos de una forma general, para un fenotipo T helper 2 (IL-13, CCL11, CCL17), el cual, según se conoce, impulsa el desarrollo de las alergias.

## 55 Resultados experimentales, Sección 2:

60 Se procedió a examinar previamente diferentes cepas de probióticos, en cuanto a lo referente a su efecto beneficioso para diferentes trastornos o desórdenes alérgicos. Una cepa bacteriana la cual ejerce un efecto probiótico contra la alergia alimentaria o contra la alergia de la piel, puede ser efectiva, o no serlo, en la reducción de los síntomas alérgicos desencadenados por los alérgenos aéreos (véase, de una forma particular : J. Nutr. Marzo del 2010; 140 (3) : 713S - 21S. e-pub. en 3 de Febrero del 2010). Los presentes experimentos, abordan el hecho de si, la *L. lactis* NCC 2287 (SL131), tiene el potencial para ejercer un efecto probiótico en las respuestas desencadenadas por los alérgenos respiratorios, de una forma adicional a sus efectos beneficiosos observados en las alergias alimentarias. El efecto de la NCC 2287 (SL131), en las alergias respiratorias, se evaluó en ensayos *ex vivo*, de

humanos, mediante la utilización de, bien ya sea PBMCs, o bien ya sea células de sangre entera, procedentes de individuos alérgicos al polen de la hierba.

La Figura 8, muestra el efecto de la NCC 2287 (SL131) en las PBMC aisladas de individuos alérgicos al polen procedente de la hierba. Correlacionándose bien con los resultados previamente observados en ensayos sesgados a Th-2. La *L. lactis* NCC 2287 (SL131) induce una fuerte producción de IFN $\gamma$  e IL-10, procedentes de PBMC alérgicas. Mediante la estimulación con una mezcla de alérgenos de la hierba, *ex vivo*, la *L. lactis* NCC 2287 (SL131), mostró ejercer un efecto beneficioso similar, en donde, ésta, incrementaba el nivel de IFN $\gamma$  y de IL-10, simultáneamente, inhibía el nivel de IL-5.

En la Figura 9, se procedió a la comparación del efecto de la *L. lactis* NCC 2287 (SL131) sobre individuos alérgicos al polen de la hierba, y sobre individuos no alérgicos al polen de la hierba, mediante la utilización de ensayo de sangre entera, humana. La Figura 9, muestra el hecho de que, la *L. lactis* NCC 2287 (SL131), intensifica la producción de IFN $\gamma$ , en ambos, los individuos alérgicos y los individuos no alérgicos al polen de la hierba, pero que incrementa los niveles de IL-10, únicamente en los individuos no alérgicos al polen de la hierba. Estos resultados, sugieren el hecho de que, la *L. lactis* NCC 2287 (SL131), tiene un efecto beneficioso contra los alérgenos respiratorios, adicionalmente a los alérgenos de los alimentos. De una forma adicional, puesto que, la IL10, no se encuentra incrementada, en los sujetos no alérgicos, mientras que, el IFN $\gamma$ , sí que se encuentra incrementado en dichos sujetos alérgicos, la NCC 2287, puede también estimular o potenciar el sistema inmune en sujetos menos inmunocompetentes.

Conclusión: Los datos obtenidos, muestran el hecho de que, el consume de la *L. lactis* NCC 2287 (SL131), por parte de un animal sensibilizado, conduce a la reducción de los síntomas alérgicos, después de la exposición a los alérgenos sensibilizantes. Este efecto, era específico, ya que, el consumo de la *L. plantarum* NCC 1107 (Lp8), no tenía un efecto protector. La reducción de los síntomas, se producía conjuntamente con unos reducidos niveles en suero de MMCP-1, y una secreción reducida de citocinas, en las células de los nódulos o ganglios linfáticos mesentéricos y los esplenocitos, así como una expresión reducida de los genes clave relacionados con la alergia en el intestino, sugiriendo el hecho de que, una modulación de los componentes en el sistema inmune, tales como los mastocitos y las células Th2, contribuye al efecto protector. Se espera un efecto similar, a partir de la cepa SL60.

El segundo juego de datos de la evaluación del efecto de *L. lactis* NCC 2287 (SL131) en las respuestas del sistema inmune, desencadenadas vía los alérgenos aéreos, sugieren el hecho de que, la cepa, puede ejercer un efecto probiótico similar, contra las alergias respiratorias, mediante el incremento de la producción de ambas citocinas, el IFN $\gamma$  y la citocina IL-10, así como también, inhibiendo la respuestas inmunes perjudiciales o dañinas (disminución en la IL-5), en los individuos alérgicos.

#### Procedimientos analíticos:

##### Reactivos y biomasa bacteriana:

Se procedió a producir la biomasa bacteriana, mediante el cultivo de cada una de las cepas, bajo unas condiciones estándar, en los cultivos líquidos. Se determinaron las cinéticas de crecimiento, para cada una de las cepas y, en concordancia con éstas, se procedió a recolectar la biomasa, 3 horas después de haber alcanzado la fase estacionaria. En este punto de tiempo, se procedió a lavar los cultivos, 2 x, en PBS frío, y éstos se congelaron en PBS al 20 % en glicerol, a una temperatura de - 80 °C, en 50  $\mu$ l de alícuotos. Los LPS (de *E. coli*), se compraron en el mercado, de procedencia de la firma Sigma (Buchs, Suiza).

##### Aislamiento y cultivo de las PBMC humanas, sesgadas hacia Th2:

Se procedió a aislar células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), a partir de filtros, los cuales se habían obtenido de en la entidad "Centre de Transfusion of the CHUV" – (Centro de Transfusión de CHUV – [CHUV = Centro Hospitalario Universitario de Vaud] - ). Las células atrapadas en los filtros, se cargaron, enjuagándolas, de nuevo, en la bolsa de colección de sangre, con 90 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBBS) (procedente de la firma Sigma. Las células, en la interfase, se recolectaron y se lavaron dos veces, con HBSS. Se procedió a resuspender las PBMC en el medio modificado del tipo "Iscove's Modified Dulbecco's Medium (cIMDM)" (de procedencia de la firma Sigma), complementado con un 10 % de suero bovino fetal FBS (de procedencia de la firma Bioconcept, Paris, Francia), un 1% L-glutamina (de la firma Sigma) un 1% de Penicilina / Estreptomicina (de la firma Sigma), y un 1% de Gentamicina (de la Sigma). Las células, se cultivaron en una placa de 48 pozos (de procedencia de la firma Milian, Meyrin, Suiza), a una tasa de  $1,5 \times 10^6$  células / ml, en presencia de 50 ng / ml de IL-4 (de la firma Bioconcept) y 1  $\mu$ g / ml de anticuerpo anti - CD40 (de procedencia de la firma R&D Systems, Abington, Inglaterra) en cIMDM, con objeto de inducir el fenotipo de citocina Th2. Se procedió a utilizar LPS, razón de 1  $\mu$ g / ml. Después de un transcurso de tiempo de cultivo de 3 días, se añadió la *L. lactis* NCC 2287, a razón de  $10^7$ ,  $10^6$ , y  $10^5$  UFC / ml. Después de haber procedido a añadir los ingredientes, se procedió a continuar con el cultivo, durante un transcurso de tiempo adicional de 48 horas, dando como resultado una duración total del cultivo de 5 días,

Aislamiento y cultivo de PBMC, procedentes de donantes humanos alérgicos a la hierba:

Se procedió a recolectar sangre venosa, heparinizada (50 ml), procedente de hombres adultos y de mujeres adultas (de una edad comprendida dentro de unos márgenes que iban desde los 18 años hasta los 40 años), con alergia confirmada (rinoconjuntivitis alérgica ó asma alérgica) al polen de la hierba, en el inicio de la estación del polen, 24 – 48 horas después de la primera incidencia de los síntomas. Las PBMC, se aislaron de la forma que ha descrito anteriormente, arriba. Se procedió resuspender las células en RPMI (Sigma) complementado con un 8 % de suero humano AB (Blutspendedienst SRK, Bern, Suiza), un 1 % de L-glutamina, un 1% de Penicilina / Estreptomicina, un 1 % de aminoácidos no esenciales (procedente de la firma Invitrogen, Lucerne, Suiza), un 1% de Piruvato Sódico (procedente de la firma Invitrogen), y un 0,1 % de Gentamicina (de procedencia de la firma Sigma). Se procedió a cultivar las células, en una placa de 96 pozos (de la firma Milian, Meyrin, Suiza), a razón de  $1 \times 10^6$  células / ml, en tres diferentes condiciones: 1) en medio, 2) en presencia de extracto de polen de alérgeno de la hierba, (ALK-Abelló, - acuoso, 6 hierbas -, Volketswil, Suiza) 3) en presencia de 50 ng / ml de IL-4 y 1 µg / ml de anti-CD40. Después de un transcurso de tiempo de 2 días de cultivo, se procedió a añadir *L. lactis* NCC 2287, a razón de  $10^7$  UFC / ml. Se continuó con el cultivo de las PBMC, durante un transcurso de tiempo adicional de días, dando como resultado una duración total de cultivo de 5 días.

Cultivo de sangre entera precedente de donantes humanos, alérgicos a la hierba, y no alérgicos a la hierba. Se procedió a recolectar sangre venosa, heparinizada (10 ml), procedente de hombres adultos y de mujeres adultas (de una edad comprendida dentro de unos márgenes que iban desde los 18 años hasta los 50 años), con bien ya sea alergia confirmada (rinoconjuntivitis alérgica ó asma alérgica) al polen de la hierba (historial clínico y test de ensayo de punción cutánea positivo), o bien ya sea no alérgicos (historial clínico y test de ensayo de punción cutánea negativo), ambos en el inicio de la estación del polen y en el pico de ésta. Las células de sangre entera (100 ml / µl), se resuspendieron en RPMI (400 µl / pozo), (Sigma) complementado con un 1 % de L-glutamina, un 1% de Penicilina / Estreptomicina, un 1 % de aminoácidos no esenciales (procedentes de la firma Invitrogen, Lucerne, Suiza), y un 0,1 % de Gentamicina (de procedencia de la firma Sigma). Se procedió a cultivar las células, en una placa de 48 pozos (de la firma Milian, Meyrin, Suiza), con o sin *L. lactis* NCC 2287, a razón de  $10^7$  UFC / ml, durante un transcurso de tiempo de 5 días.

Ensayo ELISA de citocinas:

Se procedió medir las citocinas consistentes en el IFN-γ humano, la IL-5 humana, la IL-10 humana, el IFN-γ del ratón, la IL-13 del ratón y la IL-10 del ratón, mediante la utilización de equipos a modo de kit, del tipo "DuoSet kits" procedentes de la firma R&D Systems, en concordancia con las instrucciones del fabricante. Así mismo, también, se procedió a medir las IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-8, TNF-α, IL-12, e IL-13, humanas, mediante la utilización de un equipo de ensayo a modo de "kit", de Th1 / Th2 humanos, del tipo "Th1 / Th2 10-plex multiplex kit" (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, USA), en concordancia con las instrucciones del fabricante.

Evaluación de los resultados del test de ensayo ELISA :

Se procedió a transformar los valores de OD a pg / ml, mediante la utilización de curvas estándar. Con objeto ajustar la amplia variación donante a donante, observada de una forma general con las PBMC, procedentes de diferentes donantes humanos, se procedió a estandarizar los datos, en concordancia con un patrón estándar interno arbitrario. El valor en pg / ml del IFN-γ, obtenido para cada donante, mediante la estimulación con LPS, se ajustó a un porcentaje del 100 %. Para la normalización de los valores de IL-5, la cantidad de IL-10 inducida con la cepa *B. lactis* NCC 2818 (depositada por la firma Nestec SA, bajo el registro identitario CNCM-I3446), se consideró como siendo de un 100 %. Finalmente, la cantidad de IL-5, inducida IL-4 y anticuerpo anti-CD40, en medio únicamente (a saber, en ausencia de probióticos), se ajustó a un 100 %.

Niveles de expresión genética mediante PRC a tiempo real

Se procedió a cultivar PBMC ( $1,5 \times 10^6$  células / ml), en cIMDM, con o sin IL-4 (50 ng / ml) y anti-CD40 (1 µg / ml), durante un transcurso de tiempo de tres días. Después de ello, se procedió a añadir los ingredientes a las PBMC y, las células, se recolectaron después unos transcurros de tiempo de 10 h y de 24 h. El RNA, se extrajo a partir de PBMC estimuladas con un equipo a modo de "kit" consistente en un sistema de aislamiento de RNA total del tipo "SV total RNA isolation system kit" (de la firma Promega, Wallisellen, Suiza), incluyendo un tratamiento de DNasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total, se cuantificó mediante la utilización de un equipo de ensayo, a modo de "kit", para la cuantificación del RNA, con ribogreen (Molecular Probes, Basel, Suiza). Se procedió a realizar una transcripción inversa, en 1 µg del RNA total, mediante la utilización de un equipo de ensayo, a modo de "kit", de transcriptasa inversa Multiscribe, del tipo "Multiscribe Reverse Transcriptase kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El RNA total, se mezcló con 50 µM de hexámeros aleatorios, 0,5 mM de dNTPs, 20 U de inhibidor de RNasa (Applied Biosystems), 62,5 U de transcriptasa inversa Multiscribe, 1 X tampón RT, y 5,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, en un volumen final de 100 µl. Se procedió a cuantificar las citocinas humanas IFNγ, IL-10, IL-5, Tbet, GATA3, FoxP3 (Applied Biosystems), mediante PCR a tiempo real (Applied Biosystems, ABI PRISM 7900HT), utilizando ensayos

de expresión genética TaqMan. La cuantificación, se normalizó mediante la media de 3 genes constitutivos del tipo "housekeeping gen":  $\beta$ -actina, GAPDH y HPRT (Applied Biosystems).

5 En base a los valores obtenidos del ciclo umbral (Ct), se determinó una relativa y normalizada expresión de mRNA, para cada gen, mediante la utilización del  $\Delta$ Ct. Se procedió a corregir el valor del Ct medio de tres genes del tipo "housekeeping gen". Los resultados obtenidos, se calcularon como una expresión relativa, mediante la utilización de la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct} \times K$ .

#### 10 Modelo de ratón de la alergia alimentaria a la OVA

Se procedió a sensibilizar ratones adultos BALB/c convencionales, mediante la ruta oral (con una sonda [aguja] gástrica), a intervalos semanales, con 20 mg de Ovalbúmina (OVA) procedente de la firma Fluka (Buchs, Suiza) + 10  $\mu$ g / ratón de toxina del cólera (utilizadas como adyuvante, procedente e la firma (Lucerne, Suiza), durante un transcurso de tiempo de 7 semanas. Una semana después de la última sensibilización, se llevó a cabo un reto experimental oral, con 100 mg de OVA. Se procedió a llevar a cabo la intervención nutritiva con *L. lactis* NCC 2287 (SL131) (5 x 10<sup>8</sup> UFC / ml en agua potable), en diferentes fases del experimento; como una prevención primaria durante el período de sensibilización, o como una prevención secundaria, iniciándose al final de la fase de sensibilización (Fig. 3). Quince minutos después de que los ratones se hubieron expuesto al reto experimental, éstos, éstos se observaron individualmente, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Los síntomas clínicos, se registraron y se cuantificaron, de la siguiente forma (Puntuación - [clasificación] – alérgica) 0: sin síntomas, menos de 4 episodios de rascado; 1: 4 – 10 episodios de rascado, alrededor de la nariz y de la cabeza, sin diarrea; 2: más de 10 episodios de rascado o de piel erizada, e inmovilidad o heces blandas; 3: diarrea o respiración fatigosa o cianosis. 4: diarrea en combinación con la inmovilidad, después de los picores, piel erizada, respiración fatigosa o cianosis: 4: anafilaxis. Cuatro horas después de haberse procedido a sacrificar (mediante dislocación cervical), a los ratones expuestos al reto experimental, se tomaron muestras del sangre y del último centímetro del íleon, más una placa de Peyer localizada en la misma área, y éstas se congelaron en nitrógeno líquido.

#### 25 MMCP-1 en suero

30 Se procedió a cuantificar la proteasa 1 de mastocitos murinos (MMCP-1), en el suero de los ratones, mediante un ensayo ELISA, adquirida en el mercado, de procedencia de la firma Moredun Scientific (Midlothian, Escocia), en concordancia con las instrucciones del fabricante. La concentración de MMCP-1, se obtuvo mediante la conversión de los valores de OD, en pg / ml, mediante la utilización de una curva estándar polinómica.

#### 35 Aislamiento y cultivo de linfocitos de nódulos linfáticos mesentéricos (MLN)

Se procedió a homogeneizar los MLN con un émbolo o con una jeringa, en un filtro colador de células (de procedencia de la firma BD Falcon, Milian, Meyrin Suiza). Las células, se centrifugaron y se lavaron, dos veces, en RPMI (de procedencia de la firma Sigma), complementado con un 10 % de suero bovino fetal FBS (Bioconcept, París, Francia, un 1% de L-glutamina (de la firma Sigma), un 1% de Penicilina / Estreptomicina (de la firma Sigma), un 0,1% Gentamicina (Sigma), un 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma). Las células, se cultivaron en un placa de fondo plano, de 96 pozos (Corning, Milian) en ausencia o en presencia de OVA, a razón de 1000  $\mu$ g / ml, con 3 x 10<sup>6</sup> células / ml. Después de un tiempo de cultivo de 72 horas, se procedió a congelar el cultivo de placas.

#### 45 Cultivos de citocinas en sobrenadantes de células y esplenocitos de nódulos linfáticos mesentéricos

Se procedió a medir las IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-12 del ratón, mediante la utilización de un equipo de ensayo a modo de "kit", de Th1 / Th2 humanos, del tipo "Th1 / Th2 9-plex multiplex kit" (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, USA), en concordancia con los ensayos del fabricante.

#### 50 Análisis de series de baja densidad de la expresión genética en el intestino

##### Extracción y cuantificación de RNA:

55 Se procedió a extraer ácidos ribonucleicos (RNA) totales, el íleon y la placa de Peyer, en concordancia con el protocolo del fabricante, mediante la utilización de un equipo a modo de "kit" consistente en un sistema de aislamiento de RNA total del tipo "SV total RNA isolation system kit" (de la firma Promega, Wallisellen, Suiza).

60 El RNA, se cuantificó mediante la utilización de un equipo de ensayo, a modo de "kit", con un reactivo de Ribogreen, suministrado para la cuantificación, del tipo "quant-IT Ribogreen Reagent kit", (Promega Dübendorf, Suiza), en concordancia con las instrucciones del fabricante.

*Transcripción inversa:*

Se procedió a realizar una transcripción inversa, en 1 µg de RNA total, mediante la utilización de un equipo de ensayo, a modo de "kit", de transcriptasa inversa Multiscribe, del tipo "Multiscribe Reverse Transcriptase kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El RNA total, se mezcló con 50 µM de hexámeros aleatorios, 0,5 mM de dNTPs, 20 U de inhibidor de RNasa (Applied Biosystems), 62,5 U de transcriptasa inversa Multiscribe, 1 X tampón RT, y 5,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, en un volumen final de 50 µl. La transcripción inversa, se realizó en un termociclizador del tipo "T3 thermocycler" (Biometra, Göttingen, Alemania), con el siguiente programa de los ciclos: 10 minutos a una temperatura de 25 °C, 30 minutos a una temperatura de 48 °C, 5 minutos a una temperatura de 95 °C, par a finalizar a una temperatura de 4 °C.

*Serie de baja densidad (LDA):*

Se procedió a diseñar series de baja densidad, "online" (en línea), en la website (dirección informática) de Applied Biosystems (<http://www3.appliedbiosystems.com/index.htm>). La carga, la serie y el análisis, se llevaron a cabo en concordancia con el protocolo del fabricante, en un dispositivo cuantitativo del tipo "quantitative ABI-Prism 7900HT".

La cuantificación, se normalizó con la media de 3 genes del tipo "housekeeping gen": β-actina, GAPDH y HPRT. En base a los valores obtenidos del ciclo umbral (Ct), se determinó una relativa y normalizada expresión de mRNA, para cada gen, mediante la utilización del ΔCt. Se procedió a corregir el valor del Ct medio de tres genes del tipo "housekeeping gen". Los resultados obtenidos, se calcularon como una expresión relativa, mediante la utilización de la fórmula  $2^{-\Delta Ct \times K}$ , en donde, K, es un factor 10<sup>6</sup>. Los resultados incrementados de la multiplicación de la expresión, se normalizaron a los niveles de expresión, en el grupo Negativo.

**Ejemplo 1:**

Un ejemplo de la composición para lactantes o bebés, para su uso en concordancia con la presente invención, es la que se proporciona abajo, a continuación. Esta composición, se proporciona únicamente a título de ilustración. La fuente de proteínas, es una mezcla convencional de proteína de trigo y de caseína.

Nutriente	Por 100 kcal	Por litro
Energía (kcal)	100	670
Proteína (g)	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido α-linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Prebiótico (100 % COS) (g)	0,64	4,3
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (g)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (µg)	8	50
Se (µg)	2	13

ES 2 518 490 T3

Vitamina A (µg RE)	105	700
Vitamina D (µg)	1,5	10
Vitamina E (mg TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 (µg)	8	54
Nutriente	Por 100 kcal	Por litro
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico (µg)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (µg)	0,3	2
Biotina (µg)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (µg)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>Lactococcus lactis</i> NCC 2287 (SL131; Véase la parte experimental)	2 x 10 <sup>7</sup> UFC / g de material en polvo	

**Ejemplo 2:**

5 Ejemplo de la composición de la invención: Leche en polvo adaptada, pretendida para niños. Esta composición, es una ilustración de la invención.

Nutriente	Por 100 kcal	Por litro
Energía (kcal)	100	670
Proteína (g)	3,66	24,5
Grasa (g)	4,52	30,2
Ácido linoleico (g)	0,69	4,6
Ácido α-linolénico (mg)	73	490
Hidratos de carbono (g)	11,18	74,9
Prebiótico (100 % COS) (g)	0,64	4,3

ES 2 518 490 T3

Na (mg)	49	330
Ca (mg)	183	1220

Nutriente	Por 100 kcal	Por litro
Vitamina A (µg RE)	77	520
Vitamina D (µg)	0,99	6,6
Vitamina K1 (µg)	4,7	32
Vitamina C (mg)	9	60
Niacina (mg)	1,6	11
Ácido fólico (µg)	39	260
Fe (mg)	1,5	10
Zn (mg)	1,2	7,9
<i>Lactococcus lactis</i> NCC 2287 (SL131; Veáse la parte experimental)	2 x 10 <sup>8</sup> UFC / g de material en polvo	

**Ejemplo 3:**

- 5 Un ejemplo de la composición de una bebida de yogurt, proporcionada a niños y adultos, para su uso en concordancia con la presente invención. Esta composición, es únicamente a título ilustrativo.

Nutriente	Por 120 kcal
Energía (kcal)	120
Proteína (g)	7,8
Grasa (g)	3,4
Hidratos de carbono (g)	14,4
Ca (mg)	502
Vitamina C (mg)	17
Vitamina D (IU)	85
Vitamina K1 (µg)	4,7
Zinc (mg)	2
Magnesio (mg)	29
<i>Lactococcus lactis</i> NCC 2287 (SL131; Veáse la parte experimental)	2 x 10 <sup>5</sup> UFC / g de materia seca (alternativa: 2 x 10 <sup>5</sup> UFC / g de materia seca)

**Ejemplo 4**

Un ejemplo de la composición de un producto alimenticio para animales de compañía (gatos o perros), pretendida para animales de compañía maduros, para su uso en concordancia con la presente invención. Esta composición, es únicamente una ilustración y, ésta, puede incluir combinaciones de nutrientes, de la forma que se prevé abajo, a continuación.

Las composiciones, incluyen alimentos completos, pretendidos para suministrar los requerimientos dietéticos necesarios, para un animal, o suplementos alimenticios, tales como los consistentes en premios o recompensas para animales. En varias formas de presentación, las composiciones alimentarias, tales como las consistentes en composiciones alimentarias para animales de compañía, o en composiciones consistentes en un premio o recompensa, comprenden un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 15 % hasta aprox. un 50 % de proteína cruda. El materias de proteína cruda, puede comprender proteínas vegetales, tales como las consistentes en la harina de soja, el concentrado de proteínas de soja, la harina del gluten de maíz, el gluten de trigo, la semilla de algodón, y la harina de cacahuete, o puede comprender proteínas animales, tales como las consistentes en la caseína, la albúmina, y la proteína de carne. Los ejemplos de proteína de carne de utilidad, incluyen, aquí, en este caso, a las carnes de cerdo, de cordero, de caballo, de aves (de corral), de pescado, y mezclas de entre éstas.

Las composiciones alimentarias, pueden comprender, de una forma adicional, un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 5 % hasta aprox. un 40 %, de grasa. Los ejemplos de grasas apropiadas, incluyen a las grasas animales y a las grasas vegetales. De una forma preferible, la fuente de grasas, en una grasa animal, tal como la consistente en el sebo. Pueden también utilizarse los aceites vegetales, tales como los consistentes en aceite de maíz, el aceite de girasol, el aceite de cártamo, el aceite de colza, el aceite de soja, el aceite de oliva, y otros aceites ricos en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. Las composiciones alimentarias, pueden también comprender, de una forma adicional, un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 15 % hasta aprox. un 60 %, de hidratos de carbono. Los ejemplos de los hidratos de carbono que son apropiados, incluyen a los granos o cereales, tales como los consistentes en el arroz, el maíz, el "milo", el sorgo, la cebada, los granos de soja, la cáñola, la avena, el trigo, y las mezclas de éstos. Las composiciones, pueden también comprender, de una forma opcional otros materiales tales como los consistentes en el suero láctico seco (deshidratado), u otros productos subproductos lácteos.

El contenido de humedad, para tales tipos de composiciones alimentarias, varía, en dependencia de la naturaleza de la composición del alimento o producto alimentario. Las composiciones alimentarias, pueden ser composiciones secas (tales como, por ejemplo, las consistentes en "kibble" – [croquetas o galletas pequeñas, o modo de premio o recompensa] - ), composiciones semi-húmedas, composiciones húmedas, o cualquier mezcla de entre éstas. En una forma preferida de presentación, la composición, es un producto alimenticio para animales de compañía o mascotas, completo, y nutricionalmente equilibrado. En esta forma de presentación, el producto alimenticio o alimento para animales de compañía o mascotas, puede ser un "producto alimenticio húmedo", un "producto alimenticio seco", o un producto alimenticio con un "contenido de humedad intermedia". El "producto alimenticio húmedo", describe un producto alimenticio para animales de compañía o mascotas, el cual, de una forma típica, se comercializa envasado en latas, o en bolsas a base de folios, pero éste contiene un contenido limitado de humedad, contenido éste, el cual, de una forma típica, es el correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 70 % hasta aprox. un 90 %. El "producto alimenticio seco", describe un producto alimenticio, el cual es de una composición similar al del producto alimenticio húmedo, pero, el cual, contiene un limitado contenido de humedad, el cual, de una forma típica, es el correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 5 % hasta aprox. un 15 % ó un 20 % (de una forma típica, en forma de pequeñas croquetas – "kibbles" – parecidas a pequeñas galletas). En una forma preferida de presentación, las composiciones, tienen un contenido de humedad correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 5 % hasta aprox. un 20 %. Los productos alimenticios secos, incluyen a una variedad de productos alimenticios de varios contenidos de humedad, de tal forma que, éstos, son relativamente estables, en cuanto a lo referente al tiempo de vida de conservación, y son resistentes al deterioro o contaminación microbiana o fúngica. Se prefieren, así mismo, también, las composiciones alimenticias secas, las cuales son productos alimenticios extrusionados, tales como los consistentes en los alimentos para animales de compañía o mascotas, o los consistentes en productos alimenticios del tipo "tentempiés", tanto para humanos como para animales de compañía o mascotas.

Las composiciones alimenticias, pueden también comprender una o más fuentes de fibras. El término "fibra", incluye a la totalidad de las fuentes en todas las formas de grosor, en el producto alimenticio, tanto si se trata de un producto digerible o indigerible, soluble o insoluble, fermentable o no fermentable. Las fibras preferidas, fibras consistentes en fibras de plantas, tales como las plantas marinas, pero también pueden utilizarse fuentes microbianas de fibra. Puede utilizarse una gran variedad de fibras solubles o insolubles tal y como se conocerá bien, por parte de aquellas personas usualmente expertas en el arte especializado de la técnica. La fuente de fibra, puede ser la pulpa de remolacha (procedente de la remolacha azucarera), la goma arábiga, la goma talha, el psilio, el salvado de arroz, la goma de pepita de algarroba, la pulpa de los cítricos, la pectina, los fructooligosacáridos, la oligofructosa de cadena

corta, la mananoligofructosa, la fibra de soja, el arabinogalactano, el galactooligosacárido, el arabinosilano, o mezclas de entre éstos.

5 De una forma alternativa, la fuente de fibras, puede ser una fuente fermentable. La fibra fermentable, según se ha descrito anteriormente, proporciona un beneficio al sistema inmune de un animal de compañía o mascota. La fibra fermentable, u otras composiciones, las cuales, según se conoce bien, bien, por parte de aquéllas personas usualmente expertas en el arte especializado de la técnica, proporcionan un prebiótico para mejorar el crecimiento de los probióticos, en el interior de los intestinos, puede también incorporarse en la composición, con objeto ayudar en la mejora del beneficio proporcionado por la presente invención en el sistema inmune de un animal.

10 En algunas formas de presentación, el contenido de cenizas en la composición alimenticia, es el correspondiente a unos porcentajes comprendidos dentro de unos márgenes que van desde menos de un 1 % hasta un aprox. un 15%, siendo dicho contenido, de una forma preferible, el correspondiente a unos porcentajes comprendidos dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 5 % hasta aprox. un 10%.

15 En una forma preferida de presentación, la composición, es una composición alimenticia, con un porcentaje de proteína, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 15 % hasta aprox. un 50%, un porcentaje de grasa, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 5 % hasta aprox. un 40%, un porcentaje de cenizas, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 5 % hasta aprox. un 10%, y la cual tiene un contenido de humedad, la cual es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. un 5 % hasta aprox. un 20%. En una forma de presentación, la composición alimenticia, comprende adicionalmente prebióticos o probióticos, de la forma que se ha descrito aquí, en este documento.

25 PCT

0 - 1	Forma PCT / RO / 134 (SAFE) Indicaciones relativas al (a los) Microorganismo(s) u otro Material Biológico depositado(s) (PCT Rule 13bis)	PCT Online Filing Version 3.5.000.221 MT/FOP
0 - 1 - 1	Preparados mediante la utilización de	
0 - 2	Solicitud Internacional N°	
0 - 3	Referencia del archive del solicitante o del agente	10101 - WO - PCT

1	Las indicaciones proporcionadas posteriormente, abajo, se refieren al (a los) microorganismo(s) depositado(s) u otro material biológico a los que se hace referencia en la descripción, en	
RO/EP*1 - 1	página	7*
1 - 2	línea	28*
1 - 3	<b>Identificación de depósito:</b>	<b>CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes Insitut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia 09 de Septiembre del 2009 (09.09.2009) CNCM 4227</b>
1 - 3 - 1	Nombre de la institución depositaria	
1 - 3 - 2	Dirección de la institución depositaria	
1 - 3 - 3	Fecha de depósito	
1 - 3 - 4	Número de acceso	
1 - 5	Estados designados para los cuales se han realizado la indicaciones	Todas las designaciones
2	Las indicaciones proporcionadas posteriormente, abajo, se refieren al (a los) microorganismo(s) depositado(s) u otro material biológico a los que se hace referencia en la descripción, en	
RO/EP*2 - 1	página	7*
2 - 2	línea	27*
2 - 3	<b>Identificación de depósito:</b>	<b>CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes</b>
2 - 3 - 1	Nombre de la institución depositaria	

ES 2 518 490 T3

2 - 3 - 2	Dirección de la institución depositaria	<b>Insitut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia 24 de Abril del 2009 (24.4.2009) CNCM 4154</b>
2 - 3 - 3	Fecha de depósito	
2 - 3 - 4	Número de acceso	
2 - 5	Estados designados para los cuales se han realizado la indicaciones	Todas las designaciones

PCT

3 RO/EP*3 - 1 3 - 2	Las indicaciones proporcionadas posteriormente, abajo, se refieren al (a los) micro-organismo(s) depositado(s) u otro material biológico a los que se hace referencia en la descripción, en página línea	7* 27*
3 - 3 3 - 3 - 1	<b>Identificación de depósito:</b> Nombre de la institución depositaria	<b>CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes Insitut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia 09 de Julio del 2009 (09.07.2009) CNCM 4199</b>
3 - 3 - 2	Dirección de la institución depositaria	
3 - 3 - 3	Fecha de depósito	
3 - 3 - 4	Número de acceso	
3 - 5	Estados designados para los cuales se han realizado la indicaciones	Todas las designaciones

5

ÚNICAMENTE PARA EL USO DE LA OFICINA DE RECEPCIÓN

0 - 4	Esta forma, se recibió con la solicitud internacional :  (si)	
1 0 - 4 -	Funcionario autorizado	Claudepierre, Mireille

ÚNICAMENTE PARA EL USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL

0 - 5	Esta forma, se recibió, por parte de la Oficina internacional, en	27 de Agosto del 2010 (27.08.2010)
1 0 - 5 -	Funcionario autorizado	Nathalie Wagner

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- El uso de cepas de *Lactococcus*, para la fabricación de una composición nutricional completa, para reducir los síntomas o alérgicas que se originan a partir de los alérgenos aéreos o cutáneos, en pacientes que tengan alergias desencadenadas, respectivamente, por alérgenos alimentarios, aéreos o cutáneos, en donde, la citada composición, proporciona una significativa prevención alérgica secundaria, desencadenada por los citados alérgenos alimentarios, aéreos o cutáneos.
- 10 2.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, no tiene efecto en la sensibilización de los citados pacientes a los citados alérgenos.
- 15 3.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, las citadas cepas de *Lactococcus*, son probióticos.
- 20 4.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, comprende entre  $10^5$  y  $10^8$  unidades de formación de colonias (UFC), por gramo de composición seca.
- 25 5.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, comprende por lo menos un prebiótico, el cual de una forma preferible, comprende un fructooligosacárido.
- 30 6.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, comprende un extracto de manzana, el cual comprende polifenoles, y en donde, el citado extracto de manzana, ayuda en la reducción de los síntomas de la alergia que se originan a partir de las alergias alimentarias, aéreas o cutáneas.
- 35 7.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, comprende proteínas hidrolizadas.
- 40 8.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, reduce la sensibilización de alérgenos, posteriormente, durante el transcurso de la vida.
- 45 9.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada cepa, es la consistente en la *L. lactis* NCC 2287 (SL131; CNCM-I4154), ó la *L. lactis* NCC 2180 (SL60; CNCM-I4199).
- 50 10.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, los citados síntomas, son síntomas gastrointestinales, cutáneos, oculares ó respiratorios, o una combinación de éstos.
- 55 11.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, comprende proteínas de cereales.
- 60 12.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, es una fórmula para lactantes, un cereal para lactantes, una composición líquida para niños, la cual comprende cereales, o bien un producto alimenticio para bebés.
- 65 13.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, es una composición para de cereales para lactantes y niños, de 1 a 4 años de edad.
- 14.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada composición, se proporciona a lactantes, durante el período del destete, y / o hasta 12 meses después.
- 15.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, los citados pacientes, son niños pequeños, de una edad inferior a los seis años, de una forma preferible, de una edad comprendida entre el nacimiento y los 3 años.
- 16.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, los citados pacientes, son niños quinceañeros, o adultos, los cuales sufren de alergias respiratorias.
- 17.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, los citados pacientes, son pacientes no humanos, los cuales sufren de alergias, siendo éstos, de una forma preferible, perros, gatos, o caballos.
- 18.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, los citados síntomas, se acompañan mediante la liberación de mediadores bioquímicos, tales como los consistentes en la citocinas, la triptasa, la quimasa, la histamina y los leucotrienos.
- 19.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, para inducir una estimulación o potenciación inmune, en los pacientes que presentan un estatus inmune, tales como los pacientes consistentes, de

una forma preferible, en los sujetos frágiles, los adultos mayores o de avanzada edad, los pacientes hospitalizados, los sujetos infectados y los sujetos inmunodeficientes.

5 20.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la citada cepa de *Lactococcus*, se ha activado, de tal forma que ésta se convierta en no replicable

Figura 1 / Tabla 1. Secreción de citocinas mediante PBMC humano sesgado hacia Th-2, después del co-cultivo con cepas de *Lactococcus*

	Producción de citocinas (% de referencia)		
	IFN $\gamma$ <sup>a)</sup>	IL- 10 <sup>b)</sup>	IL-5 <sup>c)</sup>
<i>L. lactis</i> NCC 2287 (SL131)	274,1	97,4	51,5
<i>L. Lactis</i> NCC 2180 (SL60)	86,2	53,0	40,8
<i>L plantarum</i> NCC NCC 1107 (Lp8)	29,4	5,7	19,1

<sup>a)</sup> Cantidad de IFN $\gamma$  inducido mediante estimulación con *E. coli* LPS purificado = 100 %

<sup>b)</sup> Cantidad de IL-10 inducida con una cepa bacteriana de referencia, con una capacidad para inducir la IL-10 = 100 %

<sup>c)</sup> Cantidad de IL-5 inducida en ausencia de cualquier (medio de) estimulación = 100 %

Figura 2 / Tabla 2. Expresión de mRNA mediante PBMC humano sesgado hacia Th-2, después del co-cultivo con *Lactococcus Lactis* NCC 2287 (SL131)

	Nivel de mRNA (expresión relativa) <sup>a)</sup>					
	Medium		LPS		NCC2287 (SL 131)	
	10 h	24 h	10 h	24 h	10 h	24 h
IFN $\gamma$	32	72	168	163	18249	3034
IL10	24	29	20	17	243	91
Tbet	38	49	57	44	194	77
IL-5	22	38	6	11	63	8
GATA-3	65	81	33	51	64	63

<sup>a)</sup> La expresión relativa se basa en los niveles de 3 genes del tipo "housekeeping gen"

Figura 3:

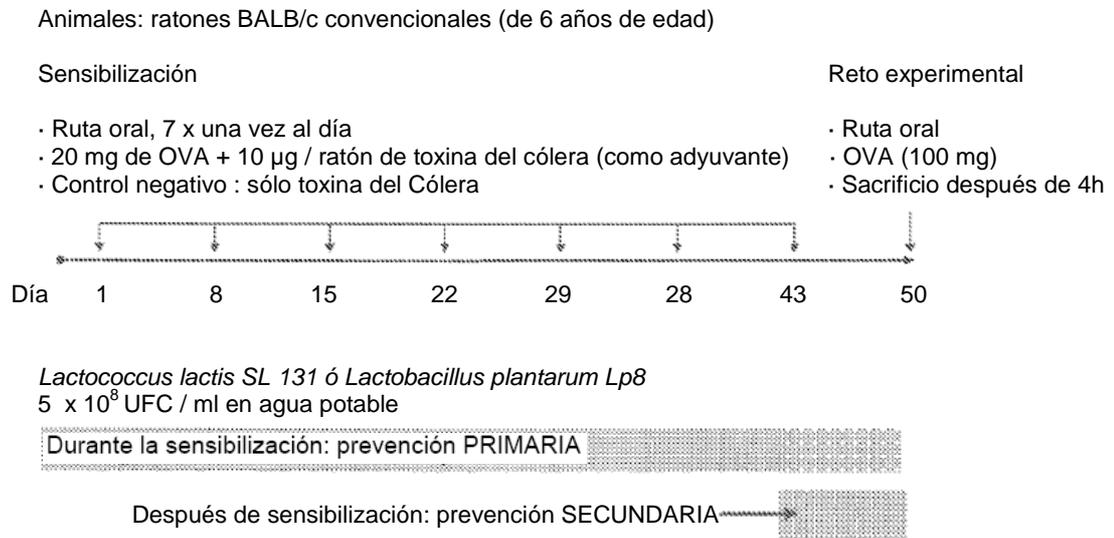


Figura 3: Descripción esquemática del modelo de la alergia alimentaria a la OVA

Figura 4:

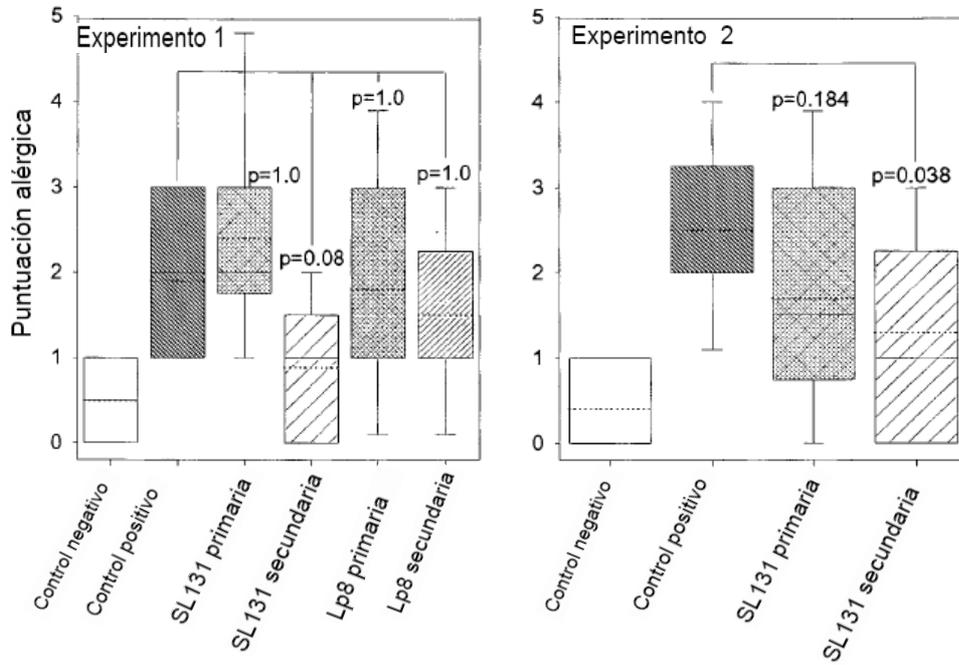


Figura 4 : Síntomas reducidos de la alergia alimentaria en los ratones los cuales reciben  $5 \times 10^8$  UFC / ml, en agua potable, de *L. lactis* NCC 2287 (SL131), durante la última semana, antes del reto experimental, pero no ratones que reciben la misma cepa, durante la fase de sensibilización, o en ratones que reciben la cepa de probiótico *L. plantarum* NCC 1107 (Lp8), Resultados de dos experimentos independientes. La línea continua, corresponde a valores de la mediana. La línea discontinua, corresponde a valores medios.

Figura 5:

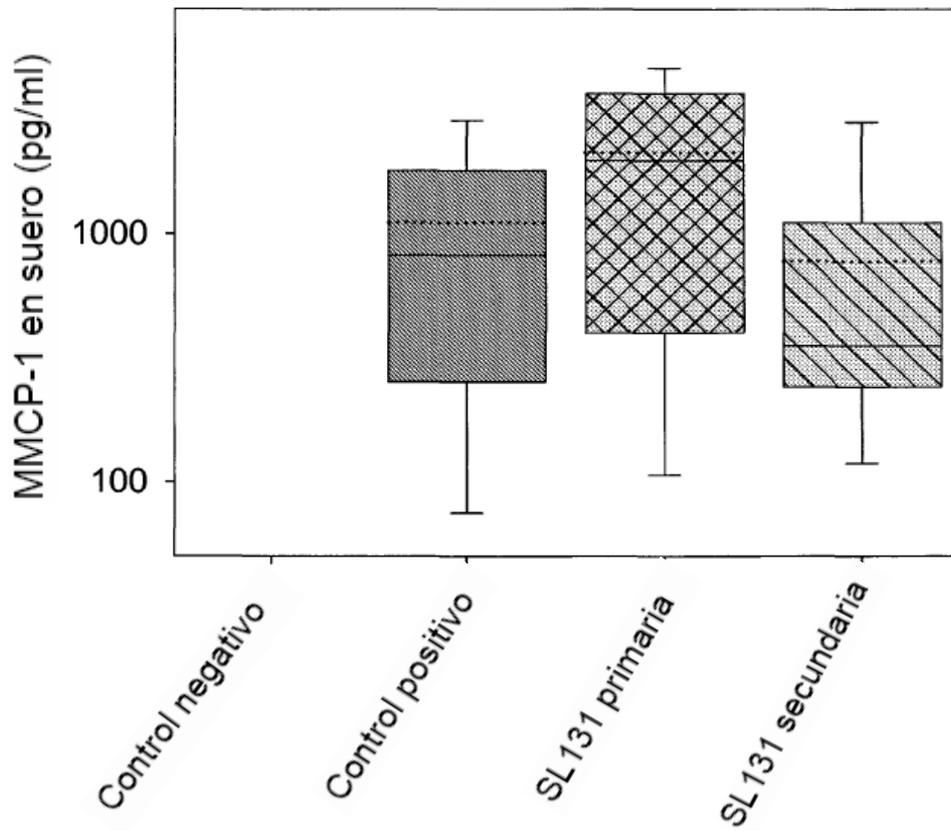


Figura 5: Niveles medios de la Proteasa 1 de los Mastocitos del Ratón (MMCP-1) en suero, después de 4 horas del reto experimental. La línea continua, corresponde a valores de la mediana. La línea discontinua, corresponde a valores medios.

## ES 2 518 490 T3

Figura 6 / Tabla 3.: Producción de citocinas, mediante linfocitos y esplenocitos de nódulos linfáticos mesentéricos, estimulados *ex vivo*.

	Producción de citocinas mediante MLN (pg / ml)							
	IL-1	IL-2	IL-4	KC	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL-5	IL-10
Control negativo	45,8	349	6,6	53,9	345,3	31,9	12	96,1
Control positivo	107,5	1062,9	97,6	206	333	703,7	73,9	475,3
SL131 <sup>a)</sup>	79,5	1013,6	56,6	255,7	251,5	317,9	73,2	330,5

	Producción de citocinas mediante esplenocitos (pg / ml)							
	IL-1	IL-2	IL-4	KC	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL-5	IL-10
Control negativo	269,9	950,4	39,8	555,9	327,7	1945,5	31,6	417
Control positivo	295,4	1225,5	184,1	764,9	349,5	3472,8	188	789,6
SL131 <sup>a)</sup>	246	916	76,9	647,6	241	1324,9	89,9	499,1

Se muestran los resultados de 1 experimento representativo.

<sup>a)</sup> La *L. lactis* NCC 2287 (SL13), se proporcionó a los ratones sensibilizados, en agua potable, durante un transcurso de tiempo de 1 semana, antes del reto experimental.

Figura 7 / Tabla 4. Niveles de expresión genética en el íleon,

Gen diana	Expresión genética relativa (mediana $\pm$ SEM y cambio del factor de multiplicación)					
	Control Negativo		Control Positivo		NCC 2287 (SL131) <sup>a)</sup>	
	Relativo <sup>b)</sup>	Factor de Multiplicación <sup>c)</sup>	Relativo <sup>b)</sup>	Factor de multiplicación <sup>c)</sup>	Relativo <sup>b)</sup>	Factor de multiplicación <sup>c)</sup>
IL-4	6 $\pm$ 1	1	16, $\pm$ 84	2,5	13 $\pm$ 8	2,1
IL-13	6 $\pm$ 1	1	648 $\pm$ 360	100,5	48 $\pm$ 62	7,4
CCL11	4703 $\pm$ 3286	1	18038 $\pm$ 6797	3,8	4638 $\pm$ 1341	1,0
CCL17	359 $\pm$ 177	1	3754 $\pm$ 888	10,5	1568 $\pm$ 521	4,4
IL-10	306 $\pm$ 163	1	2604 $\pm$ 1540	8,5	912 $\pm$ 1154	3,0
IL-12a	100 $\pm$ 148	1	830 $\pm$ 438	8,3	36 $\pm$ 630	0,4
IFN $\gamma$	775 $\pm$ 308	1	1748 $\pm$ 738	2,3	251 $\pm$ 395	0,3

<sup>a)</sup> La *L. lactis* NCC 2287 (SL13), se proporcionó a los ratones sensibilizados, en agua potable, durante un transcurso de tiempo de 1 semana, antes del reto experimental.

<sup>b)</sup> La expresión genética relativa se normalizó, para 3 genes del tipo "housekeeping gen" (GAPDH,  $\beta$ -actina, HPRT)

<sup>c)</sup> La expresión multiplicada, se normalizó a los niveles de expresión, en el grupo de Control Negativo

Figura 8: Producción de citocinas en PBMC aisladas de pacientes que sufren de alergia respiratoria y cultivadas *ex vivo* con *L. lactis* NCC 2287 (SL131), con alérgenos de polen de hierba o sin ellos. La línea continua, corresponde a los valores de la mediana.

