

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 608**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2009 E 13160279 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2612562**

54 Título: **Probióticos destinados a mamíferos hembra gestantes para mejorar la inmunidad de su progenie**

30 Prioridad:

28.03.2008 EP 08153566

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

24.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 534 608 T3

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

DESCRIPCIÓN

Probióticos destinados a mamíferos hembra gestantes para mejorar la inmunidad de su progenie

5 Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere al uso de bacterias probióticas en la elaboración de una composición nutritiva para mamíferos hembra gestantes, con el fin de aumentar el estado inmunológico de sus vástagos recién nacidos.

10 Antecedentes de la presente invención

El estado inmunológico de un recién nacido es una cuestión importante. Este estado abarca hasta la protección existente en el momento del nacimiento y hasta la adquisición de dicho estado inmunológico durante las primeras horas, días o semanas de la vida infantil. La capacidad de adquirir y mantener esta protección es un factor crucial de la salud infantil ante su nuevo entorno. En los humanos estos aspectos son de gran importancia para la salud de la población.

El mantenimiento de las madres gestantes en buen estado de salud es un factor clave para promover la salud de la progenie durante el embarazo y después del nacimiento. Los factores de salud generalmente conocidos incluyen sus hábitos nutricionales, su ingesta de micronutrientes, su historial de infecciones y además están relacionados con su estado inmunológico. Por ejemplo, la carencia de algunos minerales, vitaminas o sustancias (como el ácido fólico) pueda afectar al desarrollo del feto y también al desarrollo infantil postnatal. A este respecto la nutrición de la madre tiene un papel clave en la futura salud de los niños y se han hecho muchos esfuerzos para controlar y mejorar el balance nutricional de las madres gestantes. Los suplementos alimenticios o simplemente las guías de alimentación son esenciales para ello.

Junto a la orientación nutricional ordinaria para madres gestantes, actualmente se reconoce que algunos alimentos concretos tienen la capacidad de promover la proliferación de una microflora específica en el tracto gastrointestinal de la madre gestante. A su vez la microflora equilibrada puede tener efecto en el huésped.

El efecto beneficioso que tiene en la salud de las hembras el uso de prebióticos, es decir de sustancias nutricionales para mejorar la microflora intestinal de un huésped, se ha descrito por ejemplo en la patente WO 02/07533.

Asimismo, en la patente WO2007/105945A se ha reivindicado que la alimentación de las madres gestantes con ingredientes prebióticos, en particular con cierto tipo de sacáridos no digeribles, podría mejorar la microflora y/o el sistema inmunitario del hijo.

También se ha demostrado que complementar la ingesta nutricional con microorganismos, preferiblemente vivos, mejora el equilibrio microbiótico del tracto gastrointestinal del huésped. Se ha demostrado que la modulación de la microflora del tracto gastrointestinal por microorganismos específicos vivos tiene efectos fisiológicos positivos. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria inducida por tipos específicos de bacterias probióticas se ha estudiado y descrito abundantemente ("Cross talk between probiotics bacteria and the host immune system", The journal of nutrition [*"Influencia de las bacterias probióticas en el sistema inmunitario del huésped"*, *Revista de nutrición*], Blaise Corthesy y otros, suplemento, 2007, páginas 781S-790S). Tal como está descrito en la literatura científica, se ha demostrado que hay cepas concretas de microorganismos especialmente beneficiosas. Las de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus caseii* son ejemplos generalmente conocidos de familias que tienen efectos probióticos.

Se supone que los probióticos, al igual que otros comensales, influirán en las funciones inmunitarias del huésped, ya sea modulando la composición de la microflora y/o por actividad metabólica o por interacción directa con el sistema inmunitario subyacente a la mucosa intestinal. Tras esta interacción se activarán funciones inmunitarias, tal como lo refleja la liberación de mediadores inmunitarios (citocinas), la producción de anticuerpos y la activación de linfocitos y otras células inmunitarias. Estas células activadas, citocinas y/o compuestos bacterianos ejercerán funciones de modulación inmunitaria en diversas partes del cuerpo, a través de la circulación sanguínea. A este respecto se pretende que un efecto beneficioso en el estado inmunitario de la madre, debido a una suplementación probiótica, influya directamente en el desarrollo inmunitario del feto. También es sabido que a través de una vía entero-mamaria se podrían transportar a la leche materna y transmitir al neonato durante la lactancia células inmunitarias y otros factores bioactivos procedentes del intestino de la madre. Por tanto cabe suponer asimismo que la suplementación de las madres gestantes enriquecería la leche materna con factores inmunitarios que contribuirían al desarrollo inmunitario neonatal.

El aseguramiento de la salud futura de la progenie también es una necesidad reconocida. Más concretamente, el aseguramiento del mejor desarrollo y maduración del sistema inmunitario de la progenie es de la mayor importancia.

Normalmente, además de los tratamientos médicos para responder a estados clínicos específicos, el énfasis se pone en el buen equilibrio nutricional de las madres gestantes. Sin embargo no se sabe mucho sobre cómo potenciar específicamente el estado inmunitario del hijo durante el periodo de gestación.

El aseguramiento de la salud futura de la progenie requiere un paso adicional, con la aplicación de los hallazgos más recientes en nutrición.

5 Por consiguiente se necesita una dieta nutricional para las madres gestantes que tenga una repercusión positiva en la salud de la progenie.

10 Se necesita una ayuda concreta para garantizar el mejor sistema inmunitario de la progenie, a fin de prepararla frente a los retos antigénicos en la vida temprana y promover la maduración futura de su sistema inmunitario, así como procurar una mejor protección durante la infancia más avanzada.

15 Es necesario incidir en la formación del sistema inmunitario de la progenie en la fase más temprana posible y durante toda la gestación, así como en las primeras fases de su nueva vida, cuando el sistema inmunitario está madurando a un ritmo elevado.

20 Es necesario estimular la capacidad del sistema inmunitario de la progenie para que reaccione contra los antígenos en general y contra enfermedades infecciosas en particular.

25 Es necesario estimular aportar estos beneficios por medios que sean eficientes y no tengan ningún impacto negativo en las madres gestantes y en sus hijos.

30 Resumen de la presente invención. La presente invención está definida por las reivindicaciones.

35 En un primer aspecto la presente invención ofrece el uso de probióticos para mamíferos hembra gestantes en la elaboración de una composición de administración oral destinada a estimular la inmunidad de su progenie tras el nacimiento y caracterizada porque en dichos probióticos hay *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446.

40 En un segundo aspecto la presente invención ofrece el uso de probióticos, tal como se reivindica, durante el periodo de gestación y/o durante el periodo de lactancia de los hijos.

45 Según un tercer aspecto de la presente invención los probióticos se administran en o con la comida, las bebidas, los suplementos dietéticos o las composiciones farmacéuticas de la madre gestante, y junto con otros ingredientes activos, como por ejemplo prebióticos.

50 Descripción breve de las figuras

Las figuras 1 y 3 ilustran esquemáticamente los procedimientos experimentales de los estudios 1 y 2 descritos respectivamente.

Las figuras 2 y 4 muestran los resultados de los estudios, indicando un aumento de la inmunidad en las crías.

55 Descripción detallada de la presente invención

En esta exposición los siguientes términos tienen los siguientes significados:

40 "Mamíferos hembra gestantes" son hembras de mamífero que tienen al menos un ovocito fecundado que está desarrollándose en su útero. En la presente invención se toman preferiblemente en cuenta hembras humanas (es decir madres o futuras madres).

45 "Probiótico" significa preparados de células microbianas o de componentes de las mismas que tienen un efecto beneficioso en la salud o bienestar del huésped (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. y otros, "Probiotics: how should they be defined" [*"Probióticos: cómo deberían definirse"*] Trends Food Sci. Technol. 1999:10 107-10). El probiótico puede comprender una única cepa de microorganismo o una mezcla de varias cepas y/o una mezcla de varios microorganismos. En caso de mezclas el término en singular "probiótico" también puede usarse para designar la mezcla o preparado probiótico.

50 "Prebiótico" significa en general un ingrediente no digerible de un alimento que tiene un efecto beneficioso en el huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de microorganismos presentes en el intestino del huésped y promover la mejoría su salud.

55 "Progenie" se refiere al niño recién nacido o por nacer de las hembras de mamífero tratadas. En particular incluye la progenie que está todavía en gestación. En la presente invención se considera preferiblemente la fase juvenil / infantil (es decir, hasta la adolescencia en humanos – 12 - 14 años), con mayor preferencia se refiere al estado inmunitario de la progenie en la primera infancia (hasta 2 a 4 años en humanos).

60 Los inventores han encontrado que la administración de probióticos a mamíferos hembra gestantes puede incidir en el sistema inmunitario de la progenie y en concreto estimularlo para que pueda responder mejor y con más fuerza una vez expuesto a los antígenos. El sistema inmunitario de la progenie se puede modular muy pronto, en su vida intrauterina o en la fase temprana de su vida extrauterina, cuando el sistema inmunitario está madurando.

Los inventores han probado el efecto estimulador en ausencia obvia de contacto directo entre el sistema intestinal de los hijos y la composición de probióticos administrada a las hembras gestantes, es decir, durante la vida intrauterina de los hijos.

- 5 Los inventores han encontrado asimismo que esta composición que lleva probióticos también puede tener un efecto beneficioso en el sistema inmunitario de la progenie durante el periodo de la lactancia.

10 Sin limitarse a la teoría, se especula que la colonización parcial del tracto intestinal de las hembras gestantes por los probióticos induce la creación de una señal molecular. Se cree que el hijo recibe esta señal molecular y reacciona a ella. Además se cree que el sistema inmunitario del hijo es influido por esta señal, la cual tiene un efecto positivo en el sistema inmunitario del hijo. Esto puede mejorar la capacidad de respuesta a los antígenos tras el nacimiento. También se especula que la señal puede ser transmitida al hijo durante el periodo de lactancia, sobre todo si había un preacondicionamiento a la señal durante el periodo de gestación del hijo.

15 Hembras gestantes

La composición de la presente invención es para ser administrada a mamíferos hembra gestantes, es decir hembras que deben alumbrar hijos. El uso previsto según la presente invención se extiende desde la concepción del hijo (fecundación), pasando por todo el periodo de gestación, hasta el parto, y también puede prolongarse al periodo de lactancia, hasta el destete. El destete parcial, hasta el final de la lactancia, también está incluido en la presente invención. No se excluye que el uso previsto según la presente invención abarque también el periodo que precede inmediatamente a la fecundación, incidiendo en el estado de salud de las hembras e indirectamente en el estado de salud de la progenie.

25 Los mamíferos pueden ser hembras humanas gestantes. En este caso el periodo de gestación es unos 9 meses y el periodo de lactancia puede variar bastante según las costumbres, la cultura y el estado de salud de las mujeres. Las hembras de mamíferos también pueden ser de otras clases, incluyendo caballos y animales domésticos tales como gatos y perros. No se excluyen de la presente invención otros mamíferos hembra gestantes.

30 Microorganismos probióticos

Los microorganismos probióticos contemplados por la presente invención pueden incluir cualquier probiótico elegido del grupo constituido por bífidobacterias, lactobacilos, estreptococos, enterococos y sacaromicetos o mezclas de los mismos, preferiblemente del grupo constituido por *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johhsohii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus sp.* y *Saccharomyces boulardii* o mezclas de los mismos. Otros microorganismos probióticos no están excluidos de esta revelación, siempre que sean capaces de proporcionar el efecto estimulador del sistema inmunitario anteriormente descrito.

40 El probiótico se elige con mayor preferencia del grupo constituido por *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (referencia NCC4007 y LPR); *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446, que vende entre otros la firma Christian Hansen de Dinamarca bajo la marca comercial Bb12 (referencia NCC2818); *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, que vende Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón bajo la marca comercial BB536; *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 (referencia NCC533 y Lal); *Lactobacillus fermentum* VRI 003, que vende Probiomics (Australia) bajo la marca comercial PCC; *Bifidobacterium longum* CNCM 1-2170; *Bifidobacterium longum* CNCM 1-2618; *Bifidobacterium breve*, que vende Danisco (Denmark) bajo la marca comercial Bb-03; *Bifidobacterium breve* que vende Morinaga (Japón) bajo la marca comercial M-16V y la cepa de *Bifidobacterium breve* que vende el Institut Rosell (Lallemy) (Canadá) bajo la marca comercial R0070; *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1292; *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, que puede adquirirse entre otros de Valio Oy de Finlandia bajo la marca comercial LGG; *Enterococcus faecium* SF 68, y mezclas de ellos. Un probiótico preferido es el *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724.

Dosis de probiótico

55 El contenido de probiótico en la composición puede estar comprendido en un amplio margen de %, siempre que el probiótico concreto empleado proporcione el efecto potenciador de la inmunidad anteriormente descrito. No obstante el contenido de probiótico en la composición equivale preferiblemente a una cantidad comprendida entre 103 y 1010 ufc/g de composición seca (ufc = unidad formadora de colonias). Esta expresión incluye la posibilidad de que las bacterias estén vivas, inactivadas o muertas, o incluso que se encuentren en forma de fragmentos tales como ADN o materiales de la pared celular. En otras palabras, la cantidad de bacterias que contiene la fórmula se expresa como la capacidad formadora de colonias de dicha cantidad de bacterias, suponiendo que todas estuvieran vivas, es decir, de hecho sin tener en cuenta si están vivas, inactivadas o muertas, fragmentadas o en un estado mixto de estos tres. El probiótico está presente preferiblemente en una cantidad equivalente a 104 hasta 109 ufc/g de composición seca, con mayor preferencia en una cantidad equivalente comprendida entre 106 y 109 ufc/g de composición seca.

Método de administración

La composición se puede administrar a las hembras gestantes por varias vías, siempre que induzca el contacto entre la composición y el tracto gastrointestinal de las hembras. La composición se administra preferiblemente formando parte de la comida, de las bebidas o de los suplementos dietéticos de las hembras. También se puede administrar formando parte de una composición farmacéutica. La administración se efectúa preferiblemente por vía oral o enteral. La administración oral es la más preferida, porque tiene un menor impacto traumático en las hembras. Sin embargo en condiciones patológicas o cuando se utiliza alternativamente una alimentación por vía enteral, puede añadirse a la alimentación enteral.

Administración con otros compuestos

En cualquier caso la composición se puede administrar sola (pura o diluida en agua, por ejemplo) o mezclada con otros compuestos (tales como suplementos dietéticos, suplementos nutricionales, medicinas, vehículos, sabores, ingredientes digeribles o no digeribles). Las vitaminas y los minerales son ejemplos de suplementos dietéticos típicos. En una forma de ejecución preferida la composición se administra junto con otros compuestos que fomentan el efecto descrito sobre la inmunidad de la progenie. Estos compuestos sinérgicos pueden ser un vehículo o una matriz que facilite la liberación de los probióticos al tracto intestinal de la hembra, preferiblemente en forma activa. Dichos compuestos sinérgicos pueden influir igualmente en el estado de salud o en el metabolismo de la hembra gestante, intensificando el efecto de la composición en el sistema inmunitario del hijo. Dichos compuestos sinérgicos pueden ser otros compuestos activos que sinérgica o separadamente influyan en la respuesta inmunitaria del hijo y/o potencien el efecto del probiótico. Como ejemplo de estos compuestos sinérgicos cabe citar la maltodextrina. Uno de los efectos de la maltodextrina es proporcionar un vehículo para el probiótico que acentúe su acción y prevenir la agregación. Otros ejemplos incluyen compuestos prebióticos conocidos como los carbohidratos seleccionados del grupo formado por inulina, fructooligosacáridos (FOS), fructooligosacáridos de cadena corta (FOS de cadena corta), galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS), gangliósidos, goma guar parcialmente hidrolizada (PHGG), goma de acacia, goma de soja, lacto-goji, extractos de goji o mezclas de ellos. Puede haber otros carbohidratos como, por ejemplo, un segundo carbohidrato que actúe sinérgicamente con el primero y que esté seleccionado del grupo formado por xilooligosacáridos (XOS), goma, goma de acacia, almidón, goma guar parcialmente hidrolizada o mezclas de ellos.

El contenido del carbohidrato o carbohidratos puede ser aproximadamente de 1 g hasta 20 g o del 1% hasta el 80% o del 20% hasta el 60% en las dosis diarias de la composición. Alternativamente el contenido de carbohidratos es del 10% hasta el 80% de composición seca. No obstante, la dosis diaria de carbohidratos debe cumplir en cualquier caso las normas de seguridad y los requerimientos reglamentarios publicados. Para niños, por ejemplo, un límite típico es de 6 g/litro/día como máximo.

Según un ejemplo de la presente invención una composición nutricional comprende una fuente de proteína. Como fuente proteica se prefiere proteína dietética. La proteína dietética puede ser de cualquier tipo adecuado, como por ejemplo proteína animal (tal como las proteínas de leche, carne o huevo), proteína vegetal (tal como las proteínas de soja, trigo, arroz y guisante), una mezcla de aminoácidos o una mezcla de ellos. Se prefieren especialmente las proteínas de la leche, como la caseína, las proteínas del suero de la leche y las proteínas de soja.

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

Si la composición de la presente invención es nutricional e incluye una fuente de grasas, ésta aporta preferiblemente un 5% hasta un 55% de la energía de la composición nutricional; por ejemplo el 20% hasta el 50% de la energía, aproximadamente. El lípido que forma la fuente de grasas puede ser cualquier grasa o mezcla de grasas adecuada. La grasa vegetal es particularmente adecuada; por ejemplo los aceites de soja, de palma, de coco, de cártamo, de girasol, de maíz, de colza, lecitina y análogos. Si se desea, también puede añadirse una grasa animal como la de la leche.

A la composición nutricional se le puede agregar una fuente adicional de carbohidratos, que aporta preferiblemente un 40% hasta un 80% de la energía de la composición nutricional. Se puede usar cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrina o una mezcla de ellos.

Si se desea, también puede agregarse fibra dietética. En tal caso dicha fibra contiene aproximadamente hasta el 5% de la energía de la composición nutricional. La fibra dietética puede ser de cualquier origen adecuado, incluyendo por ejemplo soja, guisantes, avena, pectina, goma guar, goma de acacia, fructooligosacáridos o una mezcla de ellos.

En la composición nutricional se pueden incluir vitaminas y minerales en cantidad suficiente para cumplir con las normas aplicadas.

Si se desea puede incluirse en la composición nutricional uno o más emulsionantes de calidad alimentaria, como por ejemplo ésteres mono y diglicéridos de ácido diacetiltartárico, lecitina y mono o diglicéridos o una mezcla de ellos.

Asimismo se pueden incluir sales y/o estabilizantes apropiados y también se pueden incorporar saborizantes a la composición.

Periodo de administración

5 El periodo de administración se inicia con la fecundación o lo antes posible tras la fecundación (o cuando la futura madre se entera de su embarazo). No obstante el periodo de administración también puede empezar más pronto. Por ejemplo, el periodo de administración puede preceder 1 o 2 meses a la fecundación. En tal caso se cree que el estado de salud de la hembra que debe ser fecundada influirá en el estado de salud del futuro hijo. El periodo de administración también puede empezar estando la gestación avanzada, preferiblemente en el 3^{er}, 5^o o 7^o mes del embarazo (en caso de hembras humanas) o en los correspondientes periodos para otros mamíferos. También se puede contemplar un inicio muy tardío de la administración, es decir en o alrededor del 8^o o 9^o mes (pocas semanas antes del alumbramiento). En tal caso se especula que el efecto en el sistema inmunitario del hijo es rápido y de corto plazo, preparándolo mejor para la exposición a los antígenos tras el nacimiento. El periodo de administración puede ser continuo (por ejemplo hasta y durante la lactancia y hasta el destete) o discontinuo. Es preferible que el periodo de administración sea continuo, para tener un efecto más prolongado. Sin embargo se especula con que una pauta discontinua (por ejemplo la administración diaria durante 1 semana al mes) puede proporcionar "señales de estimulación discontinua del sistema inmunitario" que induzcan efectos positivos en el hijo. La duración de la administración puede variar. Si se esperan efectos positivos con un tiempo de administración relativamente corto (por ejemplo la administración diaria durante 1 semana o 1 mes), con tiempos prolongados se cree que el efecto se intensifica (por ejemplo una duración de 3, 5 o 8 meses en humanos y periodos respectivos para otros mamíferos). Es preferible que el periodo de administración cubra sustancialmente todo el tiempo de gestación. En una forma de ejecución cubre más del 50%, más del 70% o más del 80% del periodo de gestación. El periodo de administración también puede cubrir todo el periodo de lactancia o parte de él. Con mayor preferencia también puede cubrir todo el periodo de lactancia. La duración puede abarcar 0%, 30% o más, 50% o más u 80% o más del periodo de lactancia. En una forma de ejecución particular el periodo de administración de la composición puede cubrir el periodo de la lactancia (todo o parte del mismo), pero no el periodo de gestación; en este caso los beneficios de la composición se transmiten al hijo mediante la leche materna. El periodo de administración cubre sobre todo una parte (o el total) del periodo de gestación y una parte (o el total) del periodo de lactancia. Es preferible que la administración tenga lugar diariamente (una o dos veces al día) o semanalmente (una o dos veces a la semana).

En un ejemplo de la presente invención la composición también se administra directamente al hijo, siempre que la madre la haya recibido durante la gestación. Con mayor preferencia la composición se administra directamente al hijo por vía oral durante la lactancia o después del destete parcial o total. La exposición dual de la madre (durante la gestación) y del hijo (administración directa) a la composición puede aportar sinérgicamente beneficios acentuados. Se cree que la exposición durante la gestación induce la predisposición del hijo a responder mejor a la posterior administración directa.

Efecto de la composición

40 La composición de la presente invención administrada a mamíferos hembra gestantes induce la estimulación de la inmunidad de la progenie. Esta estimulación puede medirse especialmente tras el nacimiento, pero también puede empezar durante la gestación.

45 La expresión "inmunidad estimulada" empleada aquí excluye específicamente las respuestas alérgicas. La expresión "inmunidad estimulada" se define como estimulación de las funciones inmunitarias innatas y fomento de la respuesta inmunitaria específica a los antígenos. La respuesta inmunitaria innata puede consistir en respuestas celulares, actividad fagocítica, actividad leucocítica y/o anticuerpos polirreactivos. La respuesta inmunitaria específica puede consistir en activación celular y/o en respuestas de anticuerpos específicos. La expresión "inmunidad estimulada" puede incluir o se puede definir como la acentuación de las defensas inmunitarias del cuerpo y/o el incremento de la capacidad de respuesta del cuerpo a estímulos antígenos infecciosos. Dichos estímulos antígenos pueden ser virales y/o bacterianos y/o agentes parásitos o sus derivados antígenos, subunidades, compuestos de la superficie celular y/o toxinas.

55 Por ejemplo, la composición de la presente invención refuerza la transmisión de las capacidades inmunitarias de dichas hembras a dichos hijos. De este modo la composición puede proporcionar a los hijos mejores posibilidades de superar los retos de sus primeros años de vida. Por último la composición ayuda a los hijos a empezar mejor la vida y/o a estar mejor protegido contra las infecciones.

60 Por ejemplo, este efecto de estimulación es un aumento de la capacidad del hijo para responder a una exposición antígena. Al nacer, el sistema inmunitario del niño se halla tanto en un estado que lo habilita para responder de forma apropiada a exposiciones antígenas, como en un estado de rápida maduración. La exposición a los antígenos también contribuye a potenciar la maduración del sistema inmunitario. Después del nacimiento todos los niños se ven expuestos de manera natural a antígenos ambientales o patógenos. El sistema inmunitario del niño responde a tal exposición. En un ejemplo de la presente invención el sistema inmunitario del niño es capaz de responder de manera más eficiente a la exposición a los antígenos. En un caso la respuesta a la exposición antígena se puede

medir por la dosificación de anticuerpos específicos de dicho antígeno. En el contexto de la presente invención se puede medir un incremento tanto cuantitativo como cualitativo de los anticuerpos específicos. Este aumento puede medirse, por ejemplo, en el suero y/o en la saliva y/o en las heces del niño expuesto a los antígenos. Por ejemplo, la respuesta a la exposición antigénica comprende un incremento de la totalidad de anticuerpos polirreactivos, sobre todo en el suero y/o en la saliva y/o en las heces del niño. En una forma de ejecución la respuesta a la exposición antigénica comprende un aumento de la respuesta inmunitaria celular en la sangre de los hijos, preferiblemente un aumento del número y/o de la actividad de los leucocitos de dicho hijo (como ilustración véanse los resultados del ejemplo 2). Se entiende que el tipo de respuesta depende mucho del tipo de exposición, aunque algunos antígenos pueden inducir una respuesta inmunitaria compleja que puede medirse por más de uno de los efectos mencionados anteriormente (por ejemplo aumento de anticuerpos específicos y de anticuerpos polirreactivos y/o incremento de la respuesta inmunitaria celular). Las mediciones de la respuesta inmunitaria se pueden realizar mediante métodos de ensayos inmunológicos normalmente conocidos, tales como recuentos celulares, ensayos de anticuerpos, actividad fagocítica y también actividad celular citotóxica (la actividad de neutrófilos y células asesinas naturales), dosificación de marcadores inmunitarios, incluyendo citocinas, factores de crecimiento, marcadores inmunitarios de la superficie celular y análogos. El incremento se mide frente a los niveles en las correspondientes muestras de los hijos cuyas madres no fueron tratadas con la composición de la presente invención (= muestras de control).

Una exposición antigénica de particular relevancia en el contexto de la presente invención incluye, sin limitarse a ellos, la exposición a virus, preferiblemente rotavirus y adenovirus, o la exposición a bacterias infecciosas, preferiblemente *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, salmonelas, clostridios, shigella, o la exposición a parásitos infecciosos, de modo preferente a *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp* o mezclas de ellos. Para el estado de salud de los hijos es de especial importancia disponer de una mayor capacidad de respuesta a dicha exposición patógena, que contribuya a protegerlos mejor contra estos agentes patógenos y por lo tanto contra las respectivas infecciones inducidas por dichos patógenos. De manera más general puede contribuir a una mejor protección de los hijos contra muchos tipos de patógenos (= sistema inmunitario potenciado en general). En el marco de la presente invención también se puede contemplar un efecto positivo en las alergias, pues el efecto en el sistema inmunitario puede ser una respuesta mejor equilibrada y controlada a los alérgenos.

El efecto estimulante sobre el sistema inmunitario del hijo puede alcanzar un máximo durante el periodo de lactancia o durante la fase juvenil / infantil. Para los humanos este máximo de la estimulación se alcanza preferiblemente entre el nacimiento (día 0) y los 24 meses de vida, con mayor preferencia entre el nacimiento (día 0) y los 180 días de vida. No se excluye que el efecto estimulante pueda durar hasta el inicio de la edad adulta del hijo. Para los mamíferos no humanos deben considerarse periodos respectivamente equivalentes.

Ejemplo y ejemplos comparativos:

Ejemplo 1, estudio 1 con ratones (comparativo)

Material y métodos: en todos los ensayos se usaron ratones hembra BALB/c de seis semanas de edad (18-20 g) adquiridos a Charles River (Domaine des Oncins, BP 010969592, L'Arbresle Cedex, Francia). Los ratones se alojaron en condiciones específicas de ausencia de patógenos en las instalaciones para animales de la Clinique Médical Universitaire de Ginebra (CMU-Ginebra) y a cada grupo del estudio se le asignaron 6 hasta 8 crías de ratón de cada camada.

Los animales tuvieron libre acceso a una dieta normal común. Los ratones gestantes recibieron polvos de probiótico o de placebo suspendidos en el agua de beber. El agua de beber se cambió cada día. Se compararon tres grupos:

- Grupo A: control (maltodextrina)
- Grupo B: *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-2116 (ST11)
- Grupo C: *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (LPR)

Todos los productos se obtuvieron de fuentes públicas habituales. Los nombres "ST11" y "LPR" son abreviaturas o sobrenombres de los citados microorganismos.

Vacuna contra el sarampión viva atenuada (MV-S) adquirida de Aventis-Pasteur (Lyon, Francia).

Mediciones

Los anticuerpos contra el virus del sarampión (isótopos IgG1 e IgG2a) y la IgG total en suero se determinaron por ELISA en el Center for Vaccinology and Neonatal Immunology [Centro de vacunología e inmunología neonatal] (CVNI) del Centro médico universitario de Ginebra (Suiza) según normas.

Procedimiento experimental: (la figura 1 ofrece una visión esquemática del procedimiento):

1. Cuatro ratones gestantes por grupo recibieron agua de beber con A, B o C a lo largo del embarazo y durante el destete.

2. A partir del destete (3 semanas) todas las crías recibieron agua corriente sin ningún aditivo. Las madres fueron sacrificadas.
3. A las 3 semanas (inmunización infantil) las crías (5-8 por camada y 28 por grupo) se inmunizaron con virus de sarampión vivo atenuado (5×10^5 CCID₅₀).
4. Se controló semanalmente la ganancia de peso de las crías (de 3 hasta 8 semanas de edad) y se recogieron sus heces una vez a la semana (de 3 hasta 8 semanas de edad).
5. Las crías se sangraron a las 3 y 5 semanas después de la inmunización para determinar la IgG total y los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos del sarampión.
6. Cinco semanas después de la inmunización se sacrificaron todos los ratones.

Para evaluar las diferentes respuestas a la vacuna del sarampión se hicieron pruebas de Krsukal-Wallis seguidas de pruebas de Mann-Withney (Wilcoxon).

Resultados: la figura 2 ilustra gráficamente los resultados obtenidos. No se observó ningún efecto en el crecimiento del recién nacido. No se observó ninguna diferencia en las respuestas a la vacuna que estuviera relacionada con las camadas, con el género o con el peso corporal específico. En todos los grupos se observó un aumento importante de las respuestas de anticuerpos tras la vacunación del sarampión, que reflejaba un proceso normal de maduración de anticuerpos. La respuesta inmunitaria se caracterizó por una respuesta mixta Th1:Th2, como demuestran los niveles bien equilibrados de IgG1 e IgG2a observados en todos los grupos. La suplementación de las madres con ST11 no tiene ningún efecto estadísticamente significativo en la capacidad de respuesta a la vacuna del sarampión (en las condiciones del ensayo). Sin embargo la suplementación de las madres gestantes con LPR promovió títulos de IgG más elevados en comparación con los controles, sin alterar el nivel inmunitario general de respuesta a la vacuna del sarampión.

Conclusión: estos resultados parecen indicar que los efectos son específicos de la cepa probiótica. De hecho el ST11 parece tener poco efecto en la maduración inmunitaria intestinal de la cría y en la capacidad de respuesta a la vacuna del sarampión. En cambio la suplementación con LPR a las madres gestantes promovió mayores respuestas de IgG periférica a la vacuna del sarampión en los ratones adultos jóvenes.

Ejemplo 2, estudio 2 con ratones (presente invención)

Material y métodos: en todos los ensayos se usaron ratones hembra BALB/c de seis semanas de edad gestantes (18-20 g) adquiridos a Janvier, Francia). Los ratones se alojaron en condiciones específicas de ausencia de patógenos en las instalaciones para animales del Centro de investigación de Nestlé y a cada grupo del estudio se le asignaron 10 hasta 12 crías de cada camada.

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

- Grupo A: control (maltodextrina)
- Grupo B: *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446 (BL)

Todos los productos se obtuvieron de fuentes públicas habituales. El nombre “BL” es una abreviatura del citado microorganismo.

Vacuna contra el tétanos toxoide, Tetanol Pur (40 UI) adquirida de Novartis (Suiza).

Mediciones

- La proliferación de células T en el bazo en presencia de anticuerpo anti-CD3 se determinó por procedimientos normalizados. Resumiendo, se incubaron esplenocitos con anti-ratón CD3 unido a placa (2,5 µg/ml incubado 2h a 37°C, BD Pharmingen, nº de catálogo 553056) en placas de 96 pocillos a 37°C durante 72 h. La proliferación celular se determinó mediante la incorporación de [metil-3H]timidina (Amersham Pharmacia Biosciences), tal como está descrito (DeCicco, K. L., Youngdahl, J. D. y Ross, A. C. 2001 Immunology 104, 341-348). Los datos se representan como cuentas por minuto, normalizados por el porcentaje de células CD3 positivas presentes realmente en el bazo de los ratones sometidos al ensayo.

Las dosificaciones de anticuerpos IgG del suero específicos contra el tétanos toxoide se efectuaron por ELISA. En resumen, se recubrieron placas de microvaloración de 96 pocillos con 0,1 µg de antígeno TT total (Calbiochem, tétanos toxoide de *Clostridium tetani*, nº de catálogo 582231) en PBS. Después de 3 lavados con Tween 20 al 0,05% en PBS las placas se bloquearon con un tampón de SBF al 20% en PBS-Tween 20 al 0,05% en PBS durante 1 h a 37°C y luego se lavaron 3 veces más. Se incubaron diluciones en serie de los sueros de los ratones en el tampón bloqueado durante 2 h a 37°C. Después de 3 lavados las IgG específicas del TT fijado se detectaron por incubación con anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado con biotina (SouthernBiotech, nº de catálogo 1034-08) durante 1 h a 37°C. Después de 3 lavados las placas de ELISA se incubaron con estreptavidina marcada con peroxidasa (KPL, nº de catálogo 14-30-00) durante 30 minutos a 37°C. Después de 3 etapas finales de lavado se añadió sustrato de peroxidasa (KPL, nº de catálogo 50-76-00). La reacción colorimétrica se bloqueó con ácido sulfúrico y luego se midió

la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro. Después se calcularon los títulos de anticuerpo del modo descrito (Ma, Y. y Ross, A. C., 2005, Proc Natl Acad Sci. 2005 Sep 20;102(38):13556-61).

Procedimiento experimental: (la figura 3 ofrece una visión esquemática del procedimiento):

- 5
1. Dos o tres ratones gestantes por grupo recibieron agua de beber con placebo o BL a lo largo del embarazo y durante las dos primeras semanas de lactancia.
 2. A partir del destete (3 semanas) todas las crías recibieron agua corriente sin ningún aditivo. Las madres fueron sacrificadas.
 - 10 3. A las 3 semanas un subgrupo de crías de cada grupo (5-6 crías por grupo) se sacrificaron para valorar la proliferación de células esplénicas.
 4. A las 3 semanas (inmunización infantil) las crías restantes (5-6 por grupo) se inmunizaron por vía subcutánea con vacuna de TT (1/4 de la dosis humana).
 5. Cuatro semanas después de la primera inmunización se administró a las crías un refuerzo de vacuna.
 - 15 6. Las crías se sangraron 4 semanas después de la primera inmunización y 2 semanas después del refuerzo para determinar los anticuerpos IgG anti-TT; luego se sacrificaron los ratones.

Para evaluar las diferencias en la proliferación de células T y en la vacuna del TT se hicieron pruebas de Mann-Whitney (Wilcoxon).

20 Resultados: la figura 4 indica que en todos los grupos se observó un aumento de las respuestas de anticuerpos a la vacuna del TT, lo cual refleja un proceso normal de maduración de anticuerpos. La suplementación de las madres con BL durante la gestación y la lactancia promovió una mayor reactividad sistémica de las células T y títulos de IgG significativamente acentuados en comparación con el placebo.

25 Conclusiones: los dos estudios del ejemplo comparativo 1 y del ejemplo 2 destacan el hecho de que es posible promover el desarrollo inmunitario de la progenie mediante la intervención perinatal, en particular suplementando las madres durante la gestación y la lactancia con probióticos. Este efecto es específico de la cepa, tal como demuestra el estudio 1; sin embargo no parece ser específico de la especie. Realmente la suplementación de las madres con LPR o BL parece promover una mayor maduración inmunitaria de la progenie.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de probióticos en la elaboración de una composición de administración oral a mamíferos hembra gestantes para aumentar la inmunidad de su progenie tras el nacimiento, caracterizado porque dichos probióticos son *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446.
2. Uso según la reivindicación 1 para intensificar las funciones inmunitarias innatas de dicha progenie y/o promover su respuesta inmunitaria a los antígenos infecciosos.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha composición refuerza la transmisión de las capacidades inmunitarias de dichas hembras a dicha progenie.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dichas hembras de mamífero son humanas.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha composición se administra oralmente a dichas hembras a través de la comida, de suplementos dietéticos o de composiciones farmacéuticas.
- 20 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha composición se administra durante un periodo que comprende una parte del periodo de gestación de dichas hembras, la cual abarca más del 50% del periodo de gestación.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicho periodo de administración comprende una parte del periodo de lactancia de dicha progenie que abarca el 30% o más del mismo.
- 25 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicho periodo de administración comprende más del 50% del periodo de gestación y 30% o más del periodo de lactancia.
- 30 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha composición lleva otros ingredientes o probióticos seleccionados preferiblemente entre inulina, fructooligosacáridos (FOS), fructooligosacáridos de cadena corta (FOS de cadena corta), galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS), gangliósidos, goma guar parcialmente hidrolizada, goma de acacia, goma de soja, lacto-goji, extractos de goji o mezclas de ellos.
- 35 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha estimulación inmunitaria consiste en un aumento de la capacidad de la progenie para responder a una exposición antigénica.
- 40 11. Uso según la reivindicación 10, en que dicha respuesta a dicha exposición antigénica comprende:
 - un aumento de los anticuerpos específicos de dichos antígenos, preferiblemente en el suero de dicha progenie y/o en la saliva y/o en las heces, y/o
 - un aumento de la totalidad de anticuerpos polirreactivos, preferiblemente en el suero y/o en la saliva y/o en las heces de dicha progenie, y/o
 - un aumento de la respuesta inmunitaria celular en la sangre de dicha progenie, preferiblemente un aumento del número y/o de la actividad de los leucocitos de dicha progenie.
- 45 12. Uso según la reivindicación 10 u 11, en que dicha exposición antigénica comprende la exposición a virus, preferiblemente a rotavirus y adenovirus, o la exposición a bacterias infecciosas, preferiblemente *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, salmonelas, clostridios, shigella, o la exposición a parásitos infecciosos, preferiblemente a *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp* o mezclas de ellos.
- 50 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en que dicha mayor capacidad de respuesta a dicha exposición a dichos antígenos contribuye a proteger mejor dicha progenie contra las infecciones durante la infancia, y dichas infecciones comprende preferiblemente las de tipo viral, como las infecciones por rotavirus y adenovirus, o las de tipo bacteriano, como las infecciones por *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, salmonelas, clostridios, shigella, o las de tipo parasitario, como las infecciones por *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp*.
- 55 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha estimulación inmunitaria alcanza su máximo durante dicho periodo de lactancia o durante la fase juvenil de dicha progenie, preferiblemente entre el nacimiento (día 0) y los 24 meses de vida, con mayor preferencia entre el nacimiento (día 0) y los 180 días de vida.

Figura 1

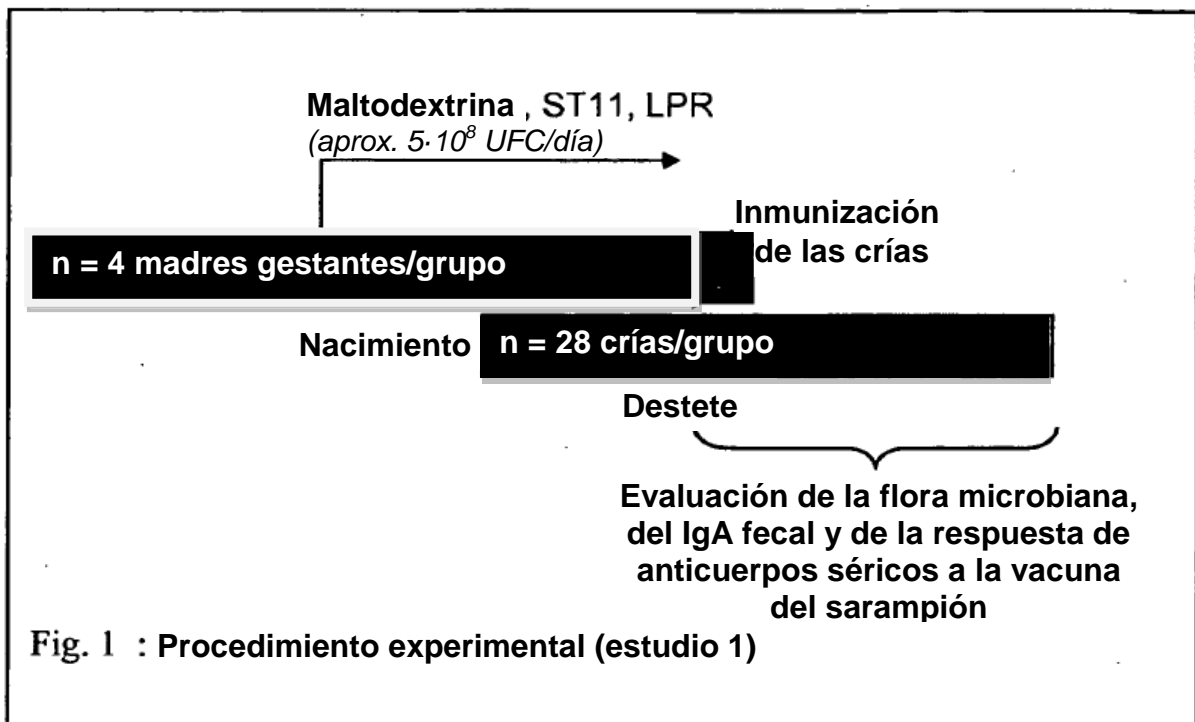


Figura 2

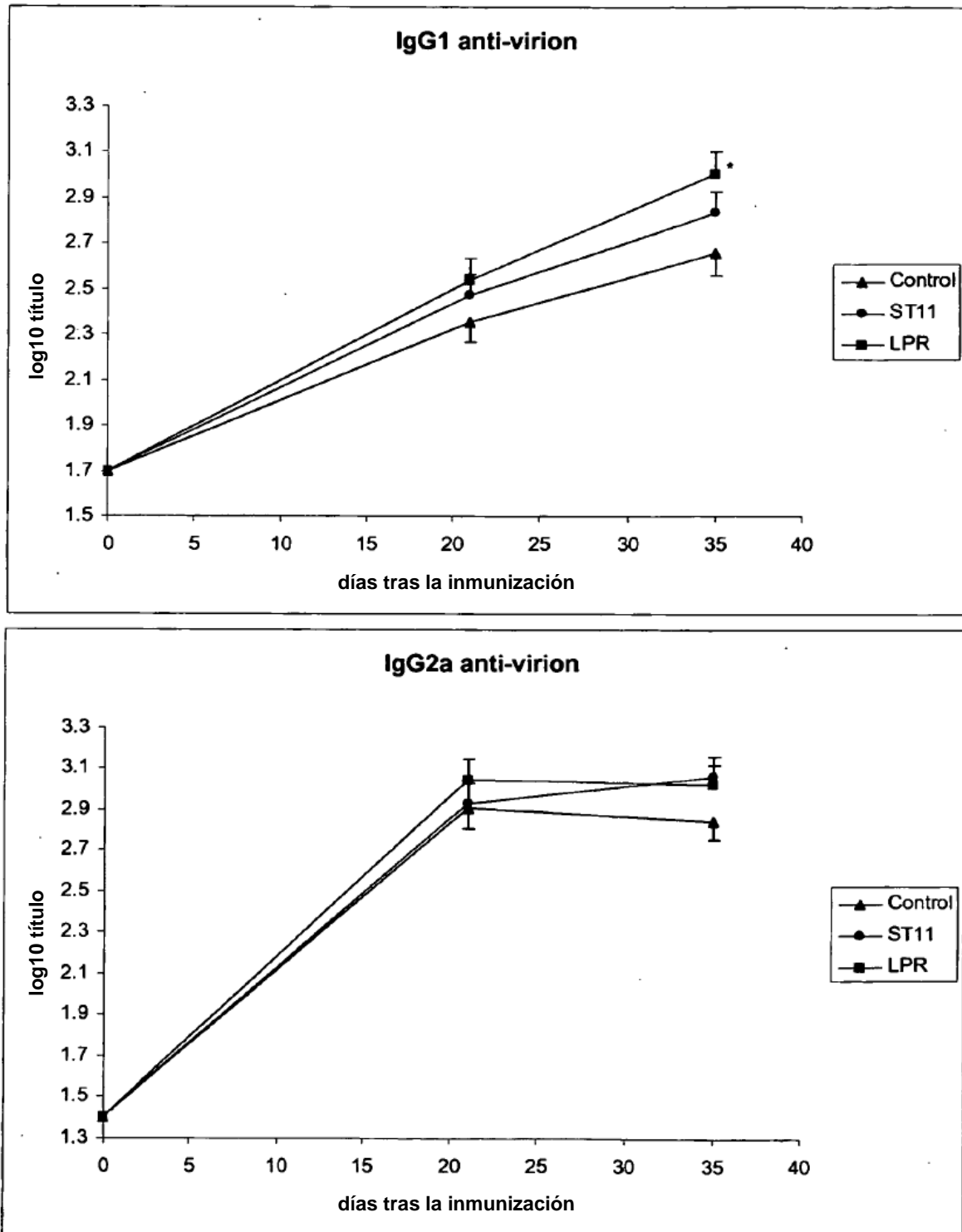


Fig. 2: respuestas de anticuerpos específicos del sarampión. Valores medios \pm ESM. *: $P = 0,03$ comparado con el control.

Figura 3

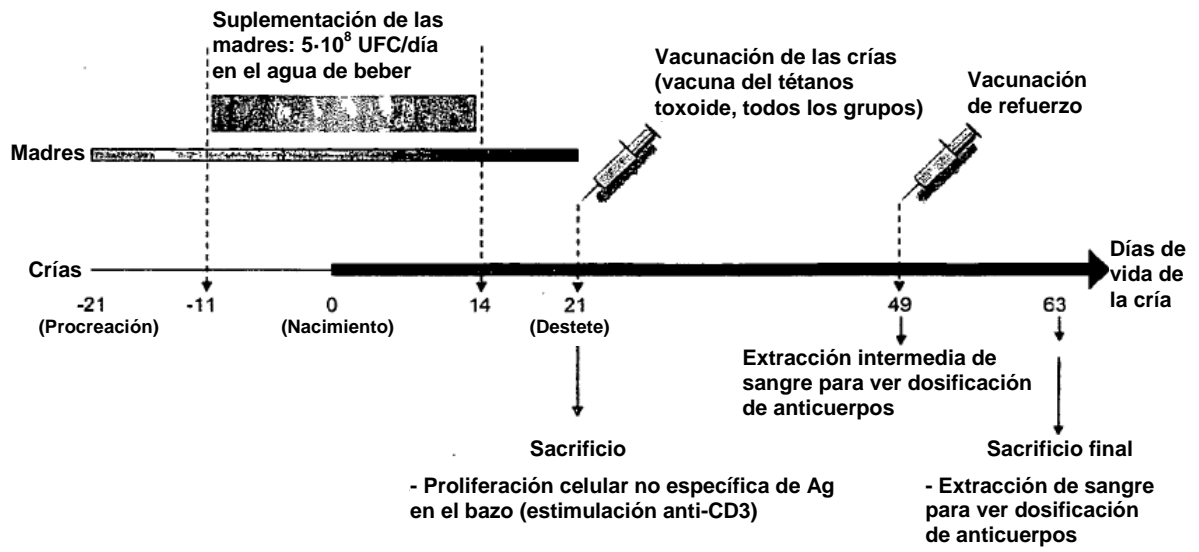


Fig. 3: diseño experimental (estudio 2)

Figura 4

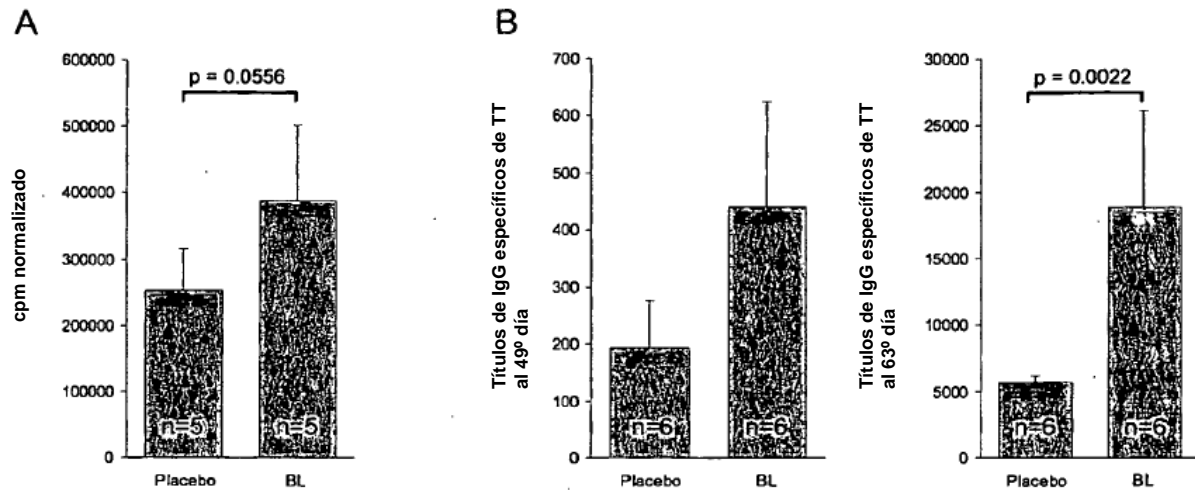


Fig. 4: respuestas sistémicas inmunitarias. (A) Proliferación de células T esplénicas no específicas de antígeno a las 3 semanas. (B) Respuestas de anticuerpos IgG anti-TT 4 semanas después de la primera inmunización (panel izquierdo) y dos semanas después del refuerzo (panel derecho). Los datos representan medianas \pm error estándar de la mediana. El número de ratones por grupo está indicado en las columnas.