

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 499**

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 13179351 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2668854**

54 Título: **Probióticos de uso en mamíferos hembra gestantes para aumentar la inmunidad de sus crías**

30 Prioridad:

28.03.2008 EP 08153566

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

10.11.2015

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 2 550 499 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 de uso en mamíferos hembra gestantes para aumentar la inmunidad de sus crías

5 Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere al uso de bacterias probióticas en la elaboración de una composición nutricional para mamíferos hembra gestantes, con el fin de potenciar el estado inmunológico en sus crías recién nacidas.

10 Antecedentes de la presente invención

15 El estado inmunológico del recién nacido es una cuestión importante. Este estado abarca desde la protección existente en el nacimiento del niño hasta la adquisición de tal protección inmunológica durante las primeras horas, días o semanas de la vida infantil. La capacidad de adquirir y mantener esta protección es un factor crucial para la salud del niño enfrentado a su nuevo entorno. En las personas estas cuestiones son de máxima importancia para la salud de la población.

20 El mantenimiento de las madres gestantes en buen estado de salud durante el embarazo es un factor clave para favorecer la salud del hijo durante la gestación y después del nacimiento. Los factores generales de salud conocidos incluyen sus hábitos nutricionales, su ingesta de micronutrientes, su historial de infecciones y está relacionado también con su estado inmunológico. Por ejemplo, las carencias de algunos minerales, vitaminas o sustancias (como el ácido fólico) pueden afectar al desarrollo del feto y también al desarrollo post-natal del niño. A este respecto la nutrición de la madre juega un papel principal en la salud futura de los niños y se han hecho muchos esfuerzos para controlar y mejorar el equilibrio nutricional de las madres gestantes. A este respecto son esenciales los suplementos alimenticios o sencillamente las pautas generales de alimentación.

25 Aparte de la guía general de alimentación para madres gestantes, ahora se admite que ciertos alimentos concretos pueden promover la proliferación de una microbiota específica en el tracto gastrointestinal de la madre gestante. A su vez la microbiota equilibrada puede tener efecto en el huésped.

30 En la patente WO 02/07533, por ejemplo, se ha descrito el uso de prebióticos - es decir, de sustancias nutricionales para mejorar la microbiota intestinal de un huésped - por sus efectos beneficiosos en la salud de las hembras.

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

40 También se ha demostrado que la complementación de la ingesta nutricional con microorganismos, preferiblemente vivos, mejora el equilibrio de la microbiota del tracto gastrointestinal del huésped. Se ha demostrado que la modulación de la microbiota del tracto gastrointestinal por microorganismos vivos específicos produce unos efectos fisiológicos particularmente positivos. Por ejemplo, la respuesta inmunológica inducida por tipos específicos de bacterias probióticas ha sido ampliamente estudiada y descrita ("Cross talk between probiotics bacteria and the host immune system" [*Interacción entre las bacterias probióticas y el sistema inmunitario del huésped*], The journal of nutrition, Blaise Corthesy y otros, suplemento, 2007, páginas 781S-790S). Tal como está descrito en la literatura científica, existen cepas específicas de microorganismos que tienen especialmente más efectos beneficiosos. En general *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus caseii* son ejemplos conocidos de familias que tienen efectos probióticos.

45 Se supone que los probióticos, como otros comensales, influyen en las funciones inmunológicas del huésped, ya sea modulando la composición de la microbiota y/o la actividad metabólica o interactuando directamente con el sistema inmunitario subyacente a la mucosa intestinal. Como consecuencia de esta interacción se activarán las funciones inmunológicas, tal como refleja la liberación de mediadores inmunológicos (citocinas), la producción de anticuerpos y la activación de los linfocitos y otras células inmunológicas. Estas células activadas, las citocinas y/o compuestos bacterianos ejercerán funciones de modulación inmunológica en varias partes del cuerpo, a través de la circulación sanguínea. A este respecto se postula que un efecto beneficioso en el estado inmunológico de la madre mediante suplementación probiótica puede influir en el desarrollo inmunológico fetal. Asimismo es sabido que las células inmunológicas y otros factores bioactivos originados en el intestino de la madre podrían ser transportados a la leche materna por una vía entero-mamaria y transmitidos al neonato durante la lactancia. Por lo tanto es válido suponer además que la suplementación de las madres gestantes enriquezca la leche materna con factores inmunológicos que contribuirían al desarrollo inmunológico neonatal.

50 Asegurar el futuro sano de la descendencia es una necesidad bien reconocida. Más concretamente, asegurar el mejor desarrollo y maduración del sistema inmunitario de la descendencia tiene la mayor importancia.

Usualmente, además de los tratamientos médicos correspondientes a estados clínicos específicos se hace hincapié en un buen balance nutricional de las madres gestantes. Sin embargo no se sabe mucho sobre cómo potenciar específicamente el estado inmunológico del hijo durante el periodo de gestación.

5 Por consiguiente es necesario un paso más para asegurar la salud futura del hijo, utilizando el hallazgo más reciente en nutrición.

Por consiguiente es necesario incidir positivamente en la salud de los hijos mediante una dieta nutricional dirigida a las madres gestantes.

10 En concreto hay la necesidad de garantizar el mejor sistema inmunitario del hijo, a fin de prepararlo lo mejor posible para los desafíos antigénicos en la primera infancia y promover la futura maduración de su sistema inmunitario para favorecer una mejor protección durante la infancia posterior.

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

20 Es necesario potenciar la capacidad del sistema inmunitario de la progenie para reaccionar contra los antígenos en general y contra las enfermedades infecciosas en particular.

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

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

30 En un primer aspecto la presente invención facilita el uso de probióticos en las hembras gestantes de mamíferos para elaborar una composición de administración oral que potencie la inmunidad de sus hijos tras el nacimiento, la cual se caracteriza porque dichos probióticos son una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446.

En un segundo aspecto la presente invención facilita el uso de los probióticos reivindicados durante la gestación y/o durante el periodo de lactancia de los hijos.

35 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 los prebióticos.

40 Descripción breve de los gráficos

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

Las figuras 2 y 4 muestran los resultados de los estudios, indicando una potenciación inmunitaria en los hijos.

45 Descripción detallada de la presente invención

Definiciones: en esta exposición los siguientes términos tienen los significados siguientes:

50 "Mamíferos hembra gestantes" son hembras de mamíferos que llevan al menos un ovocito fecundado en estado de desarrollo en su útero. En la presente invención se consideran preferentemente las hembras humanas (es decir, madres o futuras madres).

55 "Probiótico" se refiere a preparaciones de células microbianas o a componentes de células microbianas con 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 cepa única de un 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 emplearse para designar la mezcla o preparación probiótica.

60 "Prebiótico" significa en general un ingrediente alimenticio no digerible que influye beneficiosamente en el huésped estimulando de manera específica el crecimiento y/o la actividad de los microorganismos presentes en el intestino del huésped y, por tanto, tratando de mejorar su salud.

65 "Cría" se refiere al hijo recién nacido o por nacer de una hembra de mamífero. En concreto incluye la progenie que aún se encuentra en estado de gestación. En la presente invención se considera preferentemente la fase juvenil /

infancia (es decir, hasta la adolescencia humana - 12-14 años), con mayor preferencia la presente invención se refiere al estado inmunológico del hijo en la primera infancia (hasta 2 a 4 años de edad en humanos).

5 Los presentes inventores han encontrado que la administración de probióticos a las hembras de mamífero gestantes puede influir en el sistema inmunitario del hijo y más en concreto potenciarlo, para permitir una respuesta mejor y más fuerte del sistema inmunitario tras la exposición a antígenos. La modulación del sistema inmunitario de las crías puede tener lugar durante su vida intrauterina o en la fase temprana de la vida extrauterina, cuando su sistema inmunitario está madurando.

10 Los presentes inventores han demostrado el efecto potenciador en ausencia de un contacto directo obvio entre el sistema intestinal de las crías y la composición probiótica administrada a las hembras gestantes, es decir durante la vida intrauterina de las crías.

15 Además los presentes inventores han encontrado que esta composición de probióticos también puede tener un efecto beneficioso en el sistema inmunitario de las crías durante el periodo de la lactancia.

20 Sin querer limitarse a la teoría, se supone que la colonización parcial del tracto intestinal de las hembras gestantes por el probiótico induce la creación de una señal molecular. Se cree que la cría recibe y reacciona a esta señal molecular. Asimismo se cree que esta señal afecta al sistema inmunitario de la cría. Esta señal tiene un efecto positivo en la maduración del sistema inmunitario, lo cual puede mejorar la capacidad de responder a los antígenos tras el nacimiento. Además se supone que la señal se puede transmitir a la cría durante el periodo de la lactancia, sobre todo si había un preacondicionamiento a la señal durante el periodo de gestación de cría.

Hembras gestantes

25 La composición de la presente invención se usa en hembras de mamífero gestantes, es decir hembras que deben dar a luz, a las cuales se administra. El uso considerado en la presente invención se extiende desde la concepción (fecundación) hasta el parto del hijo, pasando por todo el periodo de gestación. También se puede prolongar al periodo de lactancia, hasta el destete. En la presente invención también se incluye el destete parcial, hasta el final definitivo de la lactancia. No se excluye que el uso contemplado por la presente invención incluya también el periodo inmediatamente anterior a la fecundación, que tiene un impacto en el estado de salud de las hembras y de manera indirecta en el de los hijos.

30 Los mamíferos pueden ser hembras humanas gestantes. En este caso el periodo de gestación es de unos 9 meses y el periodo de lactancia puede variar mucho según las costumbres, la cultura y el estado de salud de las hembras. Las hembras de mamífero también pueden ser de otras especies, incluyendo caballos y mascotas tales como gatos y perros. La presente invención no excluye otras hembras de mamífero gestantes.

Microorganismos probióticos

40 Los microorganismos probióticos contemplados en la presente descripción pueden incluir cualquier probiótico seleccionado del grupo formado por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Saccharomyces* o mezclas de los mismos, preferiblemente del grupo constituido por *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus sp.* y *Saccharomyces boulardii* o mezclas de ellos. Esta descripción no excluye otros microorganismos probióticos, siempre que tengan la capacidad de aportar el efecto potenciador descrito.

50 El probiótico se selecciona con mayor preferencia del grupo formado por *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (denominado NCC4007 y LPR), *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446, vendido entre otros por la compañía Christian Hansen de Dinamarca con la marca comercial Bb 12 (denominado NCC2818), *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, vendido por Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca comercial BB536, *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 (denominado NCC533 y La1), *Lactobacillus fermentum* VRI 003, vendido por Probiomics (Australia), con la marca comercial PCC, *Bifidobacterium longum* CNCM 1-2170, *Bifidobacterium longum* CNCM 1-2618, *Bifidobacterium breve*, vendido por Danisco (Dinamarca) con la marca comercial Bb-03, *Bifidobacterium breve*, vendido por Morinaga (Japón) con la marca comercial M-16V y la cepa de *Bifidobacterium breve*, vendida por el Institut Rosell (Lallemy) (Canadá) con la marca comercial R0070, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1292, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, que puede adquirirse entre otros de Valio Oy de Finlandia con la marca comercial LGG, *Enterococcus faecium* SF 68, y mezclas de los mismos. Un probiótico preferido es el *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724.

Dosis de probióticos

65 El % de probiótico en la composición puede ser muy variable, siempre que el tipo específico empleado produzca el efecto potenciador de la inmunidad descrito. Preferiblemente el contenido de probiótico en la composición está comprendido entre 10^3 y 10^{10} 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 en forma de fragmentos como ADN o materiales de 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 ellas estuvieran vivas, sin tener en cuenta si realmente están vivas, inactivadas o muertas, fragmentadas o si constituyen una mezcla de cualquiera de estos estados o de todos ellos. El probiótico está contenido preferentemente en una proporción equivalente a 10^4 hasta 10^9 ufc/g de composición seca, con mayor preferencia en una proporción equivalente a 10^6 hasta 10^8 ufc/g de composición seca.

Método de administración

La composición se puede administrar a las hembras gestantes de varias maneras, siempre y cuando induzca un contacto entre la composición y el tracto gastrointestinal de las hembras. La composición se administra de forma preferente como parte de la comida, de las bebidas o de los suplementos dietéticos de las hembras. La composición también se puede administrar formando parte de un preparado farmacéutico. La administración es preferiblemente por vía oral o enteral. Se prefiere mucho más la administración oral porque tiene un impacto menos traumático en las hembras. No obstante en los estados patológicos o cuando la alimentación enteral se emplea para otros fines, la administración de la composición se puede añadir 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, aromas, ingredientes digeribles o no digeribles). Las vitaminas y minerales son ejemplos típicos de suplementos dietéticos. En una forma de ejecución preferida la composición se administra junto con otros compuestos que potencian el efecto descrito en la inmunidad de las crías. Estos compuestos sinérgicos pueden ser un vehículo o una matriz que facilite la liberación de los probióticos en el tracto intestinal de la hembra, preferiblemente en forma activa. Estos compuestos sinérgicos también pueden influir en el estado de salud o en el metabolismo de la hembra gestante, potenciando el efecto de la composición en el sistema inmunitario del hijo. Estos compuestos sinérgicos pueden ser otros compuestos activos que influyan sinérgica o separadamente en la respuesta inmunológica del hijo y/o que potencien el efecto del probiótico. La maltodextrina es uno de tales compuestos sinérgicos. Uno de los efectos de la maltodextrina es que proporciona un vehículo para que el probiótico potencie su acción y evita la agregación. Otros ejemplos incluyen compuestos prebióticos conocidos, tales como los carbohidratos seleccionados del grupo formado por inulina, fructo-oligosacáridos (FOS), fructo-oligosacáridos de cadena corta (FOS de cadena corta), galacto-oligosacáridos (GOS), xilo-oligosacáridos (XOS), gangliósidos, goma guar parcialmente hidrolizada (PHGG), goma de acacia, goma de soja, lacto-goji, extractos de goji o mezclas de ellos. Asimismo pueden estar presentes otros hidratos de carbono, como por ejemplo un segundo carbohidrato que actúe sinérgicamente con el primer hidrato de carbono y que esté seleccionado del grupo formado por xilo-oligosacáridos (XOS), goma, goma de acacia, almidón, goma guar parcialmente hidrolizada o mezclas de ellos.

El contenido de carbohidrato o carbohidratos puede ser aproximadamente de 1 g hasta 20 g o del 1% al 80% o del 20% al 60% en las dosis diarias de la composición. Alternativamente los carbohidratos constituyen el 10% hasta el 80% de la composición seca. Sin embargo, en cualquier caso, la dosis diaria de carbohidratos debe satisfacer las normas de seguridad y los requisitos legales publicados. Un límite típico para niños es por ejemplo de 6 g/l/día como máximo.

En un ejemplo de la presente descripción, una composición nutricional comprende preferiblemente una fuente de proteínas. Como tal se prefiere una proteína dietética. La proteína dietética puede de cualquier tipo adecuado, por ejemplo animal (como proteína de leche, carne o huevo), vegetal (como proteína de soja, trigo, arroz y guisante), una mezcla de aminoácidos libres o una combinación de ellas. Se prefieren especialmente proteínas lácteas como la caseína, proteínas de trigo y proteínas de soja.

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

La composición de la presente descripción es de tipo nutricional e incluye una fuente de grasas que proporciona preferiblemente un 5% hasta un 55% de la energía de la composición nutricional, por ejemplo un 20% hasta un 50% de la energía. La fuente de lípidos puede ser cualquier grasa o mezcla de grasas adecuada. La grasa vegetal es particularmente adecuada, por ejemplo aceite de soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de cártamo, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de colza, lecitina y similares. Si se desea, también puede agregarse grasa animal, como la de leche.

A la composición nutricional se le puede añadir otra fuente de carbohidratos que le aporte preferiblemente entre un 40% y un 80% de su energía. Para ello se puede usar cualquier hidrato de carbono apropiado, como por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrina o una mezcla de ellos.

Si se desea, también puede agregarse más fibra dietética, en cuyo caso aporta hasta un 5% de la energía de la composición nutricional. La fibra dietética puede ser de cualquier origen adecuado, incluyendo por ejemplo soja, guisante, avena, pectina, goma guar, goma de acacia, fructo-oligosacáridos o una mezcla de ellos.

5 En la composición nutricional se pueden incluir vitaminas y minerales adecuados en cantidad apropiada para cumplir la normativa vigente.

10 Si se desea puede incluirse en la composición nutricional uno o más emulsionantes de calidad alimentaria, como por ejemplo ésteres de ácido diacetil-tartárico de mono- y diglicéridos, lecitina y mono- o diglicéridos o una mezcla de ellos. También pueden incluirse sales y/o estabilizantes adecuados. Se pueden añadir aromas a la composición.

Periodo de administración

15 El periodo de administración empieza con la fecundación o lo más pronto posible tras la fecundación (es decir, cuando la futura madre se entera de su embarazo). No obstante la administración 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 madre que debe fecundarse tiene un impacto en el estado de salud del futuro hijo. El periodo de administración también puede empezar relativamente tarde durante el embarazo, preferiblemente al 3^{er}, 5^o o 7^o mes de embarazo (en caso de hembras humanas) o en periodos correspondientes para otros mamíferos. También puede contemplarse un inicio muy retrasado de la administración del compuesto, p.ej. hacia el 8^o o 9^o mes (pocas semanas antes del parto). En este caso se supone que el efecto en el sistema inmunitario del hijo es rápido y de poca duración, y lo prepara adecuadamente para la exposición a los antígenos después del nacimiento. El periodo de administración puede ser continuo (por ejemplo hasta la lactancia, durante la lactancia y hasta el destete) o discontinuo. El periodo de administración es preferiblemente continuo, con el fin de lograr un efecto prolongado. No obstante se supone que una pauta discontinua (por ejemplo la administración diaria una semana al mes) puede producir unas “señales inmunes amplificadas discontinuas” que induzcan efectos positivos en el hijo. La duración de la administración puede variar. Si con una duración relativamente breve (por ejemplo, administración diaria una semana al mes) se esperan efectos positivos, se cree que los periodos largos (por ejemplo, de 3, 5 u 8 meses de duración en humanos y periodos comparables en otros mamíferos) producen un efecto acentuado. Es preferible que el periodo de administración abarque prácticamente toda la gestación. En una forma de ejecución abarca más del 50%, más del 70% o más del 80% del periodo de gestación. El periodo de administración también puede cubrir todo el tiempo de lactancia o parte del mismo, sobre todo el periodo completo de lactancia. El periodo de administración puede cubrir 0%, 30% o más, 50% o más o 80% o más del tiempo de lactancia. En una forma de ejecución concreta el periodo de administración de la composición puede abarcar el periodo de lactancia (todo o en parte), pero no el tiempo de gestación; en este caso los beneficios de la composición se transmiten al hijo por la leche materna. Con mayor preferencia el periodo de administración cubre una parte del tiempo de gestación (o todo) y una parte del periodo de lactancia (o todo). Es preferible que la administración se efectúe diariamente (una o dos tomas al día) o semanalmente (una o dos tomas por semana).

40 En un ejemplo de la presente descripción la composición también se administra directamente al hijo, siempre que la madre la haya recibido durante el embarazo. De modo preferente la composición se administra directamente al hijo, sobre todo por vía oral, durante la lactancia o tras el destete parcial o total. La exposición dual de la madre (durante el embarazo) y del hijo (administración directa) a la composición puede proporcionar realmente mayores beneficios por acción sinérgica. Se cree que la exposición durante el embarazo induce un precondicionamiento del hijo para responder mejor a la posterior administración directa.

Efecto de la composición

50 La composición de la presente invención administrada a hembras de mamífero gestantes induce la potenciación de la inmunidad en el hijo. Esta potenciación es medible sobre todo tras el nacimiento, pero puede empezar durante el periodo de gestación.

55 En concreto la expresión “potenciación de la inmunidad” aquí usada excluye las respuestas alérgicas. La expresión “potenciación de la inmunidad” se define como refuerzo de las funciones inmunológicas innatas y desarrollo de la respuesta inmunológica específica a los antígenos. La respuesta inmunológica innata puede consistir en respuestas celulares, actividad fagocítica, actividad leucocitaria y/o en anticuerpos polirreactivos. La respuesta inmunológica específica puede consistir en una activación celular y/o en respuestas específicas de anticuerpos. La expresión “potenciación de la inmunidad” puede comprender o se puede definir como la intensificación de las defensas inmunitarias del cuerpo y/o de su capacidad de respuesta a los desafíos antigénicos infecciosos. Dichos desafíos antigénicos puede ser víricos y/o bacterianos y/o agentes parásitos o sus derivados antigénicos, subunidades, compuestos de superficie celular y/o toxinas.

65 Según un ejemplo, la composición de la presente invención refuerza la transmisión de competencias inmunitarias de dichas madres a dichos hijos. De esta manera la composición tiene la capacidad de dotar a los hijos de mejores oportunidades de resistencia a los desafíos de su infancia. Esencialmente la composición ayuda a los hijos a tener un mejor inicio en la vida y/o a estar mejor protegidos contra las infecciones.

Según un ejemplo, este efecto potenciador es un aumento de la capacidad de respuesta del hijo a una exposición antigénica. Al nacer, el sistema inmunitario del niño se halla en unas condiciones que le permiten responder de forma apropiada a las exposiciones antigénicas y 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 están naturalmente expuestos a antígenos ambientales o patógenos. El sistema inmunitario del niño responde a esta exposición. En un ejemplo de la presente invención el sistema inmunitario del niño es capaz de responder de modo más eficiente a la exposición a los antígenos. Según un ejemplo, la respuesta a la exposición antigénica se puede medir mediante la dosificación de anticuerpos específicos de dicho antígeno. En el contexto de la presente invención se puede medir un aumento cuantitativo y cualitativo de los anticuerpos específicos. Según un ejemplo este aumento se puede medir en el suero y/o en la saliva y/o en las heces del hijo expuesto a los antígenos. Según un ejemplo la respuesta a la exposición antigénica comprende un aumento del total de anticuerpos polirreactivos, preferiblemente en el suero y/o en la saliva y/o en las heces del hijo. Según 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 dichos hijos (véanse como ilustración los resultados del ejemplo 2). Se entiende que el tipo de respuesta depende en gran medida del tipo de exposición, aunque algunos antígenos pueden inducir una respuesta inmunitaria compleja, medible mediante más de uno de los efectos arriba citados (por ejemplo aumento de anticuerpos específicos y anticuerpos polirreactivos y/o incremento de la respuesta inmunitaria celular). Las mediciones de la respuesta inmunitaria se pueden efectuar por métodos de inmunoensayo normalmente conocidos, tales como recuentos celulares, ensayos de anticuerpos, actividad fagocítica y actividad celular citotóxica (actividad de neutrófilos y células asesinas naturales), dosificación de marcadores inmunológicos, incluyendo citocinas, factores de crecimiento, así como marcadores inmunológicos de superficie celular y análogos. El incremento se mide frente a los niveles de las muestras correspondientes a hijos cuyas madres no estuvieron expuestas a la composición de la presente invención (= muestras de control).

Una exposición antigénica de particular importancia en el contexto de la presente invención incluye, sin limitarse a ellos, la exposición a los virus, sobre todo a los rotavirus y adenovirus, o la exposición a bacterias infecciosas, sobre todo a *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, salmonellae, clostridia, shigella, o la exposición a parásitos infecciosos, sobre todo a *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp* o mezclas de ellos. Para el estado de salud de los niños interesa especialmente que tengan una mejor capacidad de respuesta a este tipo de exposición patógena, lo cual contribuye a protegerlos más contra estos patógenos y por tanto contra las infecciones inducidas por ellos. De modo más general puede contribuir a una mejor protección del hijo contra muchos tipos de patógenos (= sistema inmunitario intensificado en general). En el marco de la presente invención también pueden contemplarse resultados positivos en caso de alergias, ya que el efecto en el sistema inmunitario puede dar lugar a una respuesta más equilibrada y mejor controlada a los alérgenos.

El efecto potenciador en el sistema inmunitario del hijo puede alcanzar un máximo durante el periodo de lactancia o durante la fase juvenil / infantil. Para los humanos la potenciación máxima se alcanza preferentemente 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 potenciador pueda durar hasta la primera fase de la edad adulta de la vida del hijo. Para los mamíferos no humanos hay que tener en cuenta los periodos correspondientes.

Ejemplo 1, estudio 1 con ratones (comparativo)

Material y métodos: en todos los ensayos se utilizaron ratones BALB/c hembra de seis semanas de edad (18-20 g) adquiridos a Charles River (Domaine des Oncins, BP 010969592, L'Arbresle Cedex, Francia). Los ratones estuvieron alojados en el recinto para animales de la Clinique Medical Universitaire de Ginebra (CMU-Geneva), en condiciones específicas libres de patógenos, y de cada camada se asignaron 6 a 8 ratones infantiles a cada grupo del estudio.

Los animales tuvieron libre acceso a una dieta regular convencional. Los ratones preñados recibieron probiótico o placebo en polvo suspendido en el agua de beber, la cual 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 usuales. Los nombres "ST11" y "LPR" son abreviaturas o denominaciones de los citados microorganismos.

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

Mediciones

- La determinación de los anticuerpos del virus del sarampión (isotipos IgG1 e IgG2a) y de IgG total en suero se realizó por ELISA en el Centro de vacunología e inmunología neonatal (CVNI) del Centro médico universitario de Ginebra (Suiza) conforme a patrones.

Procedimiento experimental (la figura 1 proporciona una visión esquemática del proceso):

1. Cuatro ratones preñados por grupo recibieron durante toda la gestación y durante el destete agua de beber que contenía A, B o C
2. Desde el destete en adelante (3 semanas) todas las crías recibieron agua normal, sin ningún aditivo. Las madres se sacrificaron.
3. A las 3 semanas (inmunización infantil) las crías (5-8 por camada, 28 por grupo) se inmunizaron con virus vivo atenuado del sarampión (5×10^5 CCID₅₀).
4. Las crías se controlaron semanalmente (desde las 3 hasta las 8 semanas de edad) para ver su aumento de peso y una vez a la semana se recogieron heces (desde las 3 hasta las 8 semanas de edad).
5. Las crías se sangraron a 3 y 5 semanas de la inmunización para determinar la IgG total y los anticuerpos específicos del sarampión IgG1 e IgG2a.
6. A las 5 semanas de la inmunización se sacrificaron todos los ratones.

Para evaluar las diferencias respecto a la vacuna del sarampión se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis seguidas de pruebas de Mann-Whitney (Wilcoxon).

Resultados: la figura 2 es una ilustración gráfica de los resultados obtenidos. No se detectó ninguna diferencia en el crecimiento de los recién nacidos. No se observaron diferencias de respuesta a la vacuna relacionadas con las camadas, el género o el peso corporal específico. En todos los grupos se observó un aumento de las respuestas de anticuerpos tras la vacunación del sarampión, lo cual refleja un proceso normal de maduración de los anticuerpos. La respuesta inmunológica se caracterizó por respuestas mixtas Th1:Th2, tal como demuestran los niveles bien equilibrados de IgG1 e IgG2a observados en todos los grupos. La suplementación de las madres con ST11 no tuvo un efecto estadísticamente significativo en la capacidad de respuesta de la cría a la vacuna del sarampión (en las condiciones del ensayo). Sin embargo la suplementación de las madres gestantes con LPR promovió unos títulos de IgG más elevados en comparación con los controles, sin alterar el perfil inmunológico general de la respuesta a la vacuna del sarampión.

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

Ejemplo 2, estudio 2 con ratones (comparativo)

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

Los animales tuvieron libre acceso a una dieta regular convencional. Los ratones preñados recibieron probiótico o placebo en polvo suspendido en el agua de beber, la cual 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 conocidas. El nombre "BL" es una abreviatura del citado microorganismo.

La vacuna toxoide del tétanos Tetanol Pur (40 UI) se adquirió a Novartis (Suiza).

Mediciones

- La proliferación de células T del bazo en presencia de anticuerpo anti-CD3 se determinó según procedimientos estándar. En resumen, se incubaron esplenocitos con anti-CD3 de ratón unido a placa (2,5 µg/ml incubados 2 h a 37°C, BD Pharmingen, nº de cat. 553056) en placas de 96 pocillos a 37°C durante 72 h. La proliferación celular se determinó incorporando [metil-3H]timidina (Amersham Pharmacia Biosciences) del modo descrito (DeCicco, K. L., Youngdahl, J. D. y Ross, A. C. 2001 *Immunology* 104, 341-348). Los datos están representados en cuentas por minuto, normalizados por el porcentaje de células CD3-positivas realmente presentes en el bazo de los ratones sometidos al estudio.

Las dosificaciones de anticuerpos IgG en suero específicos del toxoide del tétanos se llevaron a cabo por ELISA. En resumen, se recubrieron placas de microvaloración de 96 pocillos con 0,1 µg de antígeno TT completo (Calbiochem, toxoide del tétanos procedente de *Clostridium tetani*, nº de cat. 582231) en PBS. Tras 3 lavados con Tween 20 al 0,05% en PBS las placas se bloquearon con un tampón de FCS al 20% - Tween 20 al 0,05% en PBS durante 1 h a 37°C y luego se lavaron nuevamente 3 veces. Durante 2 h a 37°C se incubaron en tampón de bloqueo diluciones en serie de sueros de ratón. Después de 3 lavados, las IgG específicas de TT fijadas se detectaron incubando con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con biotina (Southern Biotech, nº de cat. 1034-08) durante 1 h a

37°C. Tras 3 lavados, las placas de ELISA se incubaron con estreptavidina marcada con peroxidasa (KPL, nº de cat. 14-30-00) durante 30 minutos a 37°C. Tras 3 etapas finales de lavado se añadió sustrato de peroxidasa (KPL, nº de cat. 50-76-00). La reacción colorimétrica se bloqueó con ácido sulfúrico y luego se midió la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro. Después se calcularon los títulos de los anticuerpos del modo descrito (Ma Y. y Ross A.C., Proc. Natl. Acad. Sci. 102(38):13556-61, 20 de sept. de 2005).

Procedimiento experimental (la figura 3 proporciona una visión esquemática del proceso):

1. Durante toda la gestación y durante las primeras dos semanas de lactancia, dos a tres ratones preñados de cada grupo recibieron agua de beber que contenía placebo o BL.
2. Desde el destete en adelante (3 semanas) todas las crías recibieron agua normal, sin ningún aditivo. Las madres se sacrificaron.
3. A las 3 semanas se sacrificó un subgrupo de crías de cada grupo (5 - 6 crías por grupo) con el fin de evaluar la proliferación de células esplénicas.
4. A las 3 semanas (inmunización infantil), las crías restantes (5 - 6 crías 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 una vacuna de refuerzo.
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 y después se sacrificaron los ratones.

Para evaluar las diferencias en la proliferación de células T respecto a la vacuna de TT se realizaron pruebas de Mann-Whitney (Wilcoxon).

Resultados: la figura 4 muestra en todos los grupos un incremento significativo de las respuestas de anticuerpos tras la vacunación de TT, lo cual refleja un proceso normal de maduración de los anticuerpos. La suplementación de las madres con BL durante la gestación y la lactancia promovió una mayor reactividad sistémica de las células T e incrementó significativamente los títulos de IgG en comparación con el placebo.

Conclusiones: los dos estudios de los ejemplos 1 y 2 ilustran el hecho de que es posible estimular el desarrollo inmunológico en la prole mediante la intervención perinatal, en particular mediante la suplementación de las madres con probióticos durante la gestación y la lactancia. Estos efectos son específicos de la cepa, tal como indica el estudio 1; aunque aparentemente no son específicos de la especie. En efecto, la suplementación de las madres gestantes con LPR o BL parece promover una mayor maduración inmunológica en la prole.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de probióticos para elaborar una composición de administración oral a hembras de mamífero gestantes, con el fin de potenciar la inmunidad de su progenie tras el nacimiento, caracterizado porque dichos probióticos son una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 y *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1 para potenciar las funciones inmunológicas innatas y/o promover la respuesta inmunológica específica de dicha progenie a los antígenos infecciosos.
- 15 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha composición refuerza la transmisión de competencias inmunitarias de dichas hembras a dicha progenie.
- 20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dichas hembras de mamífero son humanas.
- 25 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha composición se administra por vía oral a dichas hembras a través de comida, bebidas, suplementos dietéticos o composiciones farmacéuticas.
- 30 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha composición se administra durante un periodo que comprende parte del tiempo de gestación de dichas hembras, en concreto más del 50% del tiempo de gestación.
- 35 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicho periodo de administración comprende parte del periodo de lactancia de dicha progenie, en concreto 30% o más del periodo de lactancia.
- 40 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicho periodo de administración comprende más del 50% del tiempo de gestación y 30% o más del periodo de lactancia.
- 45 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha composición comprende además otros ingredientes o prebióticos, escogidos preferiblemente entre inulina, fructo-oligosacáridos (FOS), fructo-oligosacáridos de cadena corta (FOS de cadena corta), galacto-oligosacáridos (GOS), xilo-oligosacáridos (XOS), gangliósidos, goma guar parcialmente hidrolizada, goma de acacia, goma de soja, lacto-goji, extractos de goji o mezclas de ellos.
- 50 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha potenciación inmunitaria comprende un aumento de la capacidad de la progenie para responder a una exposición antigénica.
- 55 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha exposición antigénica comprende:
 - un aumento de los anticuerpos específicos de dichos antígenos, preferentemente en el suero y/o en la saliva y/o en las heces de dicha progenie, y/o
 - un aumento del total de anticuerpos polirreactivos, preferentemente 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.
- 60 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, sobre todo a *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *salmonellae*, *clostridia*, *shigella*, o la exposición a parásitos infecciosos, sobre todo a *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp* o mezclas de ellos.
- 65 13. Uso según una de las reivindicaciones 10 a 12, en que dicho aumento de la capacidad de respuesta a dicha exposición antigénica contribuye a proteger mejor la progenie contra las infecciones en la infancia, en concreto contra infecciones víricas como las producidas por rotavirus y adenovirus, o contra infecciones bacterianas como las producidas por *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *salmonellae*, *clostridia*, *shigella*, o contra infecciones parasitarias como las producidas por *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium spp*.
- 70 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha potenciación 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

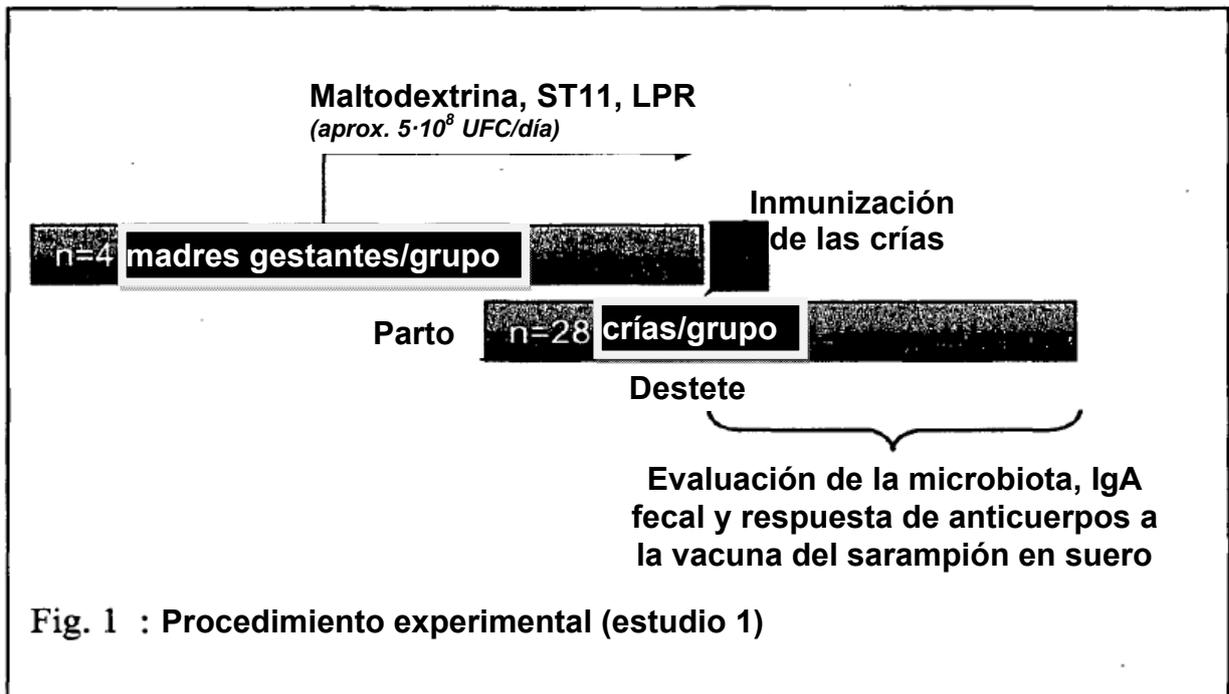


Fig. 1 : Procedimiento experimental (estudio 1)

Figura 2

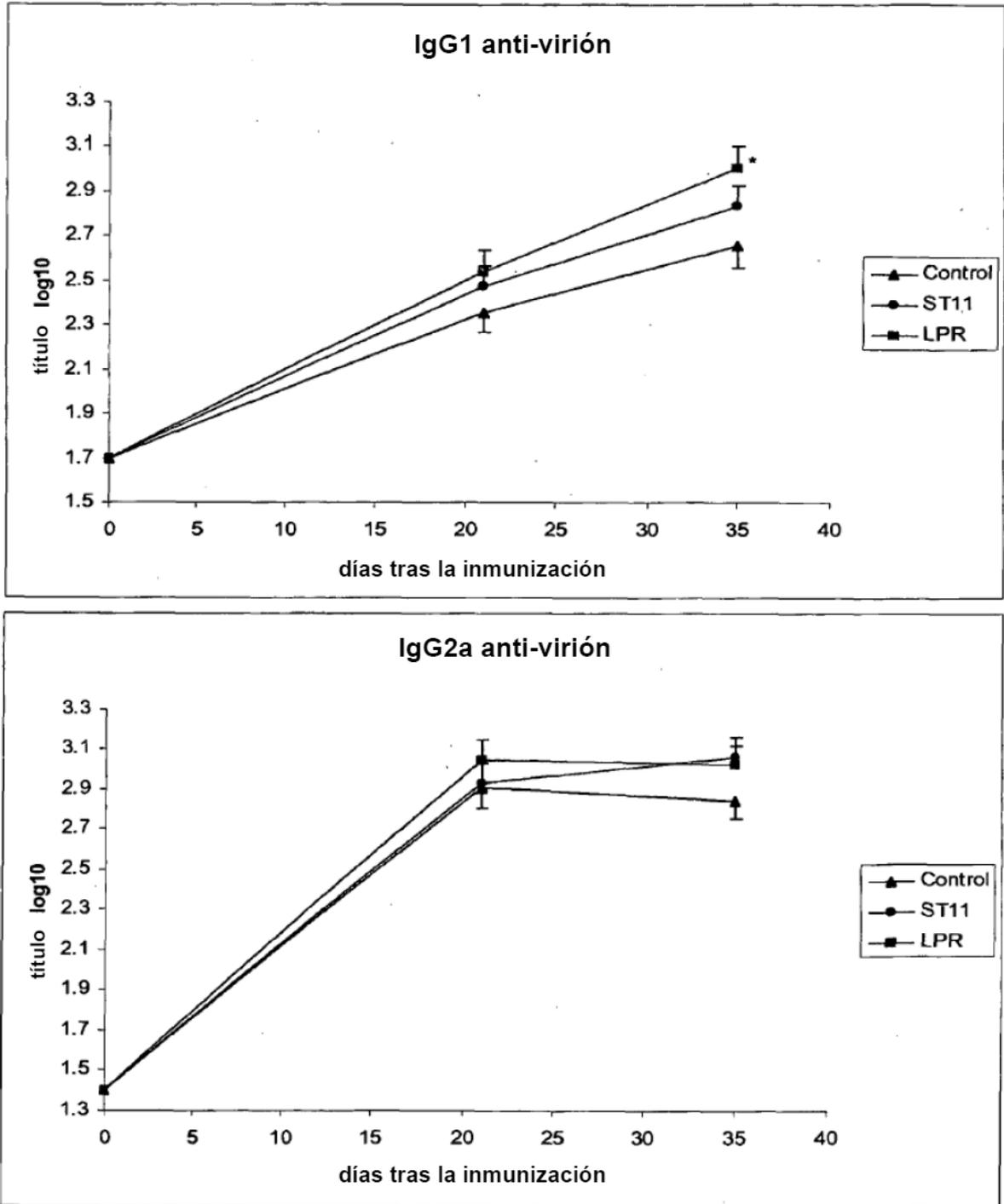


Fig. 2: respuestas de anticuerpos específicos del sarampión. Valores medios \pm ESM. *: $P = 0,03$ comparado con el control.

Figura 3

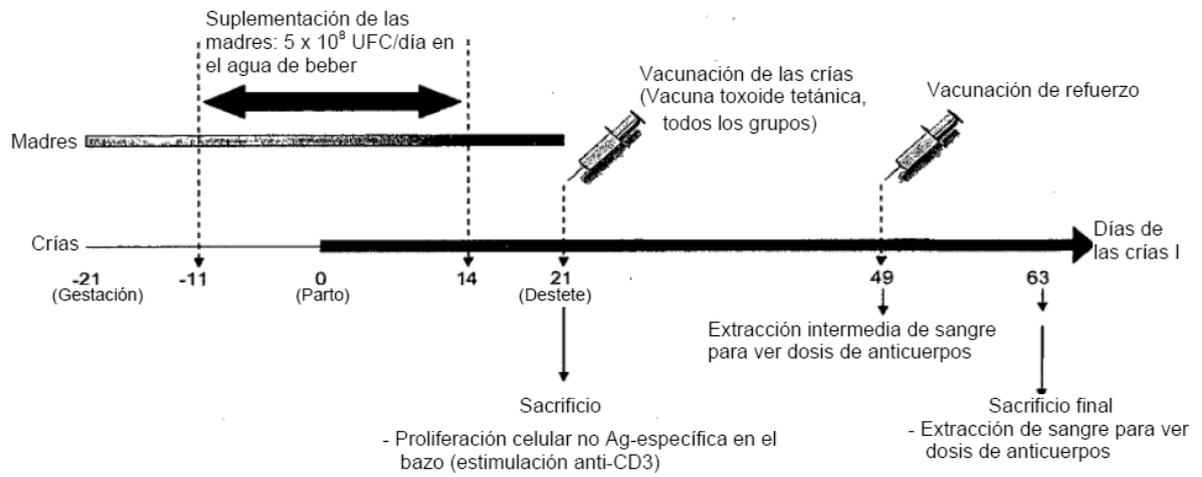


Fig. 3: diseño experimental (estudio 2)

Figura 4

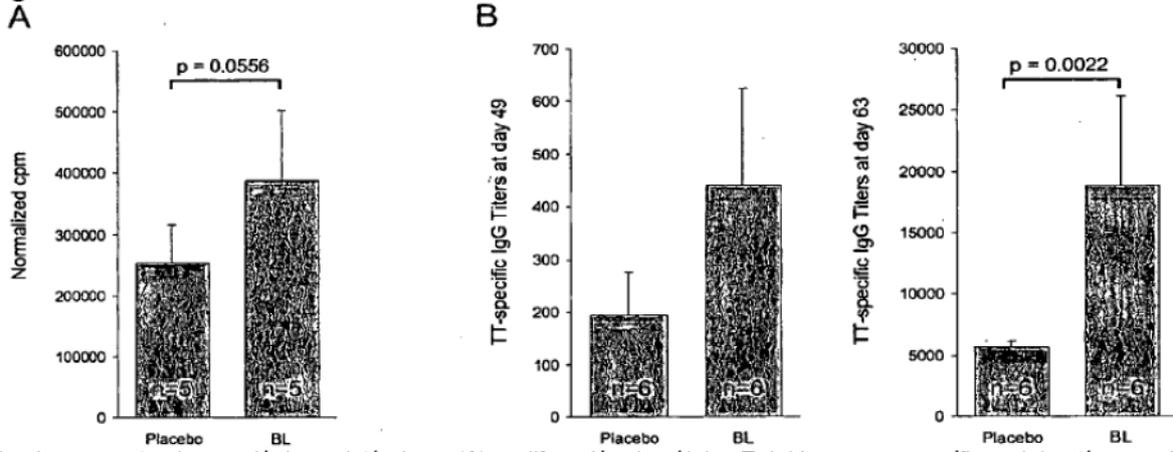


Fig. 4: respuestas inmunológicas sistémicas. (A) proliferación de células T del bazo no específicas del antígeno a las 3 semanas. (B) respuestas de anticuerpos IgG anti-TT a las 4 semanas de la primera inmunización (panel izquierdo) y dos semanas después del refuerzo (panel derecho). Los datos representan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