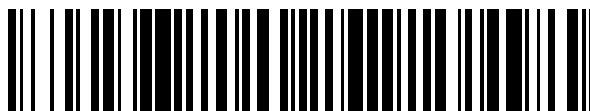


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 008**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/747** (2015.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A23K 1/00** (2006.01)

**A61P 37/04** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10717656 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2429538**

54 Título: **Bifidobacterium longum NCC2705 no replicante y trastornos inmunitarios**

30 Prioridad:

**11.05.2009 EP 09159925**

**11.05.2009 EP 09159929**

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

**10.02.2016**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)**

**Avenue Nestlé 55**

**1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**PETIT, VALÉRIE;**

**GARCIA-RODENAS, CLARA;**

**JULITA, MONIQUE;**

**PRIOULT, GUÉNOLÉE;**

**MERCENIER, ANNICK y**

**NUTTEN, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 559 008 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**

Bifidobacterium longum NCC2705 no replicante y trastornos inmunitarios

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de la prevención y/o tratamiento de los trastornos inflamatorios e infecciosos, en particular mediante la estimulación de las defensas antimicrobianas endógenas. Una forma de ejecución de la presente invención es el uso de *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) para usar en el tratamiento o prevención de los trastornos relacionados con el sistema inmunitario, incluyendo infecciones.
- 10 Nuestro medio ambiente está contaminado por una vasta serie de microorganismos potencialmente patógenos. Los queratinocitos de la piel y las células epiteliales que revisten los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario constituyen en conjunto una barrera física que protege el cuerpo de la intrusión microbiana.
- 15 Además estos epitelios ayudan a las defensas del huésped, produciendo y secretando agentes antimicrobianas que limitan el acceso de bacterias y otros microorganismos. Estas moléculas antimicrobianas son componentes clave de la línea básica de defensa de la inmunidad innata.
- 20 Las defensas son una de las clases más importantes de péptidos antimicrobianos en los humanos. Las defensas son producidas por células epiteliales de los pulmones, de la piel, de la cavidad oral y de los tractos genitourinario, respiratorio y gastrointestinal. Entre ellas figura la familia de la  $\beta$ -defensina, que incluye las defensas 1 (hBD1) y 2 (hBD2).
- 25 La hBD1 se expresa en la superficie de varias mucosas, tales como la mucosa oral, de las glándulas salivales, del estómago, del intestino delgado, colon, hígado y páncreas. La hBD2 también se encuentra en las células epiteliales de varias superficies de mucosas, incluyendo las del tracto gastrointestinal. Además estas dos defensas también se encuentran en la saliva y en el fluido de la superficie de las vías respiratorias (Cunliffe, R.N. y Mahida, Y.R. 2004, J Leukoc. Biol. 75:49-58).
- 30 En los tejidos normales los niveles de hBD2 son muy bajos y su expresión es intensificada por bacterias y citocinas proinflamatorias. Al contrario que la hBD2, la hBD1 se expresa constitutivamente. No se ha demostrado nunca que la expresión de la hBD1 sea incrementada por bacterias o inflamaciones (Ou, G., y otros, 2009, Scand. J Immunol 69:150-161).
- 35 Es bien sabido que los probióticos pueden reforzar las distintas líneas de defensa intestinal: exclusión inmunitaria, eliminación inmunitaria y regulación inmunitaria. También es sabido que los probióticos estimulan la resistencia inespecífica del huésped a los microbios patógenos, ayudando a erradicarlos.
- 40 No obstante, se ha indicado que las bacterias probióticas no influyen en la expresión de la hBD1 constitutiva (O'Neil, D.A. y otros, J Immunol 163:6718-6724) y que las cepas comensales (*Escherichia coli*) y patógenas (*Salmonella typhimurium*) solo la incrementan muy ligeramente (Ou, G., y otros, 2009, Scand. J Immunol 69:150-161).
- 45 Actualmente la aplicación de probióticos se basa en la reducción del riesgo de enfermedades relacionadas con la disfunción de la barrera intestinal (E. Isolauri, y otros, 2002, Gut 2002; 50: iii 54-iii 59). Se cree que los probióticos son efectivos debido a su supervivencia en el intestino y a su estabilidad en medio ácido y a la bilis, así como por la colonización temporal de las mucosas en el tracto intestinal.
- 50 Por consiguiente, la mayor parte de la literatura publicada trata de probióticos vivos. Sin embargo varios estudios investigaron los beneficios saludables aportados por bacterias no replicantes y la mayoría de ellos indicaron que la inactivación de los probióticos, p.ej. por tratamiento térmico, produce una pérdida de su señalado efecto beneficioso para la salud (Rachmilewitz, D., y otros, 2004, Gastroenterology 126:520-528; Castagliuolo, y otros, 2005, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43:197-204; Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, Br. J. Nutr. 86:285-289; Kaila, M., y otros, 1995, Arch. Dis. Child 72:51-53).
- 55 Sin embargo, trabajar con bacterias viables en productos alimenticios tiene hoy en día varios inconvenientes. Las bacterias viables no suelen ser muy resistentes al estrés y por lo tanto son difíciles de manipular a escala industrial manteniendo su viabilidad. Además, para algunas clases de producto no sería lo mejor agregar microorganismos viables a la formulación, por motivos de seguridad.
- 60 Por otra parte la provisión de microorganismos probióticos no replicantes permite la reconstitución en caliente, p.ej. de composiciones nutricionales en polvo, conservando el beneficio para la salud del paciente consumidor.
- En base a ello sería deseable trabajar con bacterias no replicantes en vez de sus homólogas vivas, pero los estudios existentes al respecto no son alentadores
- 65 El uso de probióticos vivos como estrategia para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias del intestino ha sido referido en la literatura y recientemente revisado por Dotan y otros (Dotan, I. y D. Rachmilewitz. 2005; Curr. Opin.

5 Gastroenterol. 21:426-430). Por ejemplo, se ha demostrado que un cóctel altamente concentrado de ocho bacterias  
 10 probióticas vivas (VSL#3) es efectivo para prevenir (Gionchetti, P., y otros, 2003, Gastroenterology 124:1202-1209) y  
 15 tratar la reservoritis refractaria recurrente en humanos (Gionchetti, P., y otros, 2000, Gastroenterology 119:305-309;  
 Mimura, T., y otros, 2004, Gut 53:108-114). Sorprendentemente, empleando un modelo murino de colitis inducida  
 por DSS, Rachmilewitz y otros (Rachmilewitz, D., y otros, 2004, Gastroenterology 126:520-528) indicaron que los  
 20 tratamientos con VSL#3 viable e irradiado con rayos  $\gamma$  - pero no con VSL#3 neutralizado térmicamente - protege  
 contra la colitis. Análogamente la *L. crispatus* neutralizada térmicamente no logró proteger contra la colitis inducida  
 por DSS y en cambio su homóloga viable redujo claramente la pérdida de peso corporal y la actividad de la MPO en  
 el intestino (Castagliuolo, y otros, 2005, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43:197-204). Estos estudios sugieren que  
 25 los probióticos vivos son más efectivos que sus homólogos no replicantes en el contexto de la inflamación intestinal.

Se encontró que la *L. reuteri* inactivada (neutralizada térmicamente e irradiada con rayos  $\gamma$ ) no podía disminuir la  
 producción de IL-8 en células T84 inducida por TNF $\alpha$ , mientras que su homóloga viva mostró un importante efecto  
 15 beneficioso (Ma, D., y otros, 2004, Infect. Immun. 72:5308-5314).

Por tanto en este campo se necesitan composiciones naturales, fáciles de manipular en condiciones industriales,  
 que sean seguras y fáciles de administrar, y que permitan prevenir y/o tratar trastornos inflamatorios e infecciosos,  
 en particular mediante la estimulación de las defensas endógenas antimicrobianas.

20 La composición natural debería prepararse partiendo de cultivos probióticos, en particular de un microorganismo  
 probiótico bien aceptado en la actualidad y reconocido por los consumidores por ser beneficioso para la salud. La  
 composición debería contener por conveniencia bacterias no replicantes y ser más efectiva que su homóloga viva.

Los presentes inventores han abordado esta necesidad.

25 Por consiguiente la presente invención tenía por objeto mejorar el estado técnico y proporcionar una composición  
 natural que permitiera prevenir y/o tratar trastornos inflamatorios e infecciosos, en particular mediante la estimulación  
 de las defensas endógenas antimicrobianas, y que cumpliera los requisitos arriba mencionados.

30 Los presentes inventores se sorprendieron al ver que podían lograr el objetivo de la presente invención mediante el  
 contenido de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes definen además formas de  
 ejecución preferidas de la presente invención.

El contenido de la presente invención se refiere al reforzamiento de las defensas endógenas antimicrobianas en los  
 35 mamíferos mediante la administración de un producto que contenga microorganismos de tipo no replicante, como  
 por ejemplo los microorganismos tratados térmicamente.

Los presentes inventores refieren que el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) tiene mayores  
 efectos en la inducción de la expresión de péptidos antimicrobianos que los anteriormente identificados y descritos  
 40 en la literatura.

Se encontró por ejemplo que:

45 - el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) induce la expresión de la hBD2 más fuertemente que  
 otros microorganismos y también que la combinación de 8 bacterias (Mondel, M., y otros, 2009, Mucosal. Immunol  
 2:166-172; Schlee, M., y otros, 2007, Infect. Immun. 75:2399-2407), y

- el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) tratado térmicamente intensifica la expresión de la  
 hBD2 más fuertemente que su homólogo vivo y además también intensifica la expresión de la hBD1.

50 La hBD1 y la hBD2 muestran actividad antibacteriana contra un amplio espectro de bacterias, incluyendo *E. coli* y  
*Pseudomonas aeruginosa*, *H. pylori* (Nuding, S., y otros, 2009, Microbes. Infect. 11:384-393) y también contra  
 levaduras tales como *Candida albicans* (O'Neil, D.A. 2003, Mol. Immunol 40:445-450) y contra virus (virus de la  
 inmunodeficiencia humana) (Kota, S. y otros, 2008, J. Biol. Chem 283:22417-22429). Por lo tanto estos péptidos  
 antimicrobianos pueden reforzar la barrera mucosa y en consecuencia limitar la adherencia e invasión bacteriana.  
 55

Hay más y más pruebas de que los niveles de defensinas disminuyen en ciertas condiciones patofisiológicas, lo cual  
 es un factor de riesgo en la patogénesis y complicaciones de enfermedades infecciosas e inflamatorias tales como  
 (Doss, M. y otros, 2010, J Leukoc. Biol 87:79-92; Rivas-Santiago, B. y otros, 2009, Infect. Immun. 77:4690-4695):

60 - En el tracto respiratorio:  
 fibrosis quística, enfermedad reactiva de las vías respiratorias, infecciones pulmonares por fumar tabaco, asma,  
 neumonía, rinitis, otitis, sinusitis, tuberculosis.

- En el tracto gastrointestinal:  
 enfermedad de Crohn (colon e íleon), colitis ulcerosa, gastritis y úlcera gástrica inducida por infección por  
 65 *Helicobacter pylori*, diarrea infecciosa, enterocolitis necrosante, diarrea asociada a antibióticos, inmadurez intestinal.

- En el tracto genitourinario:

vaginosis bacteriana, VIH, virus del herpes simple, infección urinaria.  
- En la piel:  
dermatitis atópica, úlcera crónica, carcinoma, eczema atópico, quemadura.  
- En la cavidad oral:  
5 pacientes de VIH, amigdalitis, gingivitis, caries dental.  
- Queratitis en los ojos.

10 Los resultados aquí presentados indican que el *B. longum* NCC 2705 (CNCM I-2618) tiene mayor capacidad de estimular la defensa endógena antimicrobiana que las bacterias probióticas anteriormente identificadas y por tanto puede ser más eficiente en la prevención y tratamiento del SBID (sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado) y de los trastornos inflamatorios e infecciosos. Además, al contrario de lo que cabría esperar por la literatura, los datos de los presentes inventores indican que el tratamiento no reduce, sino que aumenta aún más el fuerte efecto antimicrobiano del *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618).

15 Por consiguiente, una forma de ejecución de la presente invención es una composición que comprende *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicante, para usar en el tratamiento o prevención de trastornos relacionados con el sistema inmunitario, incluyendo las infecciones, tal como se declara en la reivindicación 1.

20 Según la presente invención, los trastornos relacionados con el sistema inmunitario se pueden tratar o prevenir aumentando la expresión de la hBD1 y/o hBD2 endógena.

25 La presente invención también se refiere a una composición que incluye *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) para usar en el tratamiento o en la prevención de los trastornos relacionados con una expresión reducida de hBD1, como por ejemplo las infecciones bacterianas.

La presente invención también se refiere al empleo de *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicante para preparar una composición destinada al tratamiento o prevención de trastornos relacionados con el sistema inmunitario.

30 Se usan *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicantes. Las *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicantes, en particular las tratadas térmicamente, tienen la ventaja de ser incluso más efectivas que sus homólogas vivas.

35 El uso de *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicantes, tratadas térmicamente, en vez de sus homólogas vivas también es ventajoso porque:

40 - reduce el riesgo de sepsis relacionada con probióticos vivos en poblaciones diana sensibles,  
- representa una alternativa segura para los pacientes inmunodeprimidos, y  
- permite elaborar productos líquidos estables al almacenamiento de larga duración, empleando un proceso de tecnología de obstáculos de nivel inferior.

45 Por lo tanto, en una forma de ejecución de la presente invención al menos el 90%, por ejemplo al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%, con mayor preferencia al menos el 99% e idealmente al menos el 99,9% de todas las *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no son replicantes.

La presente invención también se refiere a una composición que incluye *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618), donde al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%, con mayor preferencia al menos el 99% e idealmente al menos el 99,9% de las *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) son no replicantes.

50 *B. longum* NCC 2705 "no replicante" comprende las *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) que han sido tratadas térmicamente, incluyendo las *B. longum* NCC 2705 inactivadas, muertas, inviables y/o presentes en forma de fragmentos tales como ADN, metabolitos, compuestos citoplasmáticos y/o materiales de pared celular.

55 "No replicante" significa que no se pueden detectar células inviables ni unidades formadoras de colonias mediante los métodos clásicos de cultivo en placa, los cuales están resumidos en el libro de microbiología de James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden. 2005. Modern food microbiology [*Microbiología moderna de los alimentos*]. 7ª edición, Springer Science, Nueva York, N.Y. 790 p. La ausencia de células viables se puede detectar típicamente del siguiente modo: ninguna colonia visible sobre placas de agar o ningún aumento de turbidez en el medio líquido de cultivo tras la inoculación con diferentes concentraciones de preparados bacterianos (muestras no replicantes) e incubación en condiciones apropiadas (en atmósfera aeróbica y/o anaeróbica durante al menos 24 h).

60 El *B. longum* NCC 2705 se puede hacer no replicante por inactivación térmica. La inactivación térmica tiene lugar a unos 70°C como mínimo.

65 Para inactivar los probióticos se puede emplear cualquier tratamiento térmico, siempre que dure lo suficiente para lograr la inactivación. Por ejemplo, dicho tratamiento térmico se puede efectuar durante al menos 10 segundos.

Normalmente una temperatura elevada requiere un tiempo corto de calentamiento, mientras que las temperaturas bajas necesitan mayor tiempo de calentamiento.

5 Por ejemplo, el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) se puede hacer no replicante entre 110°C y 140°C durante 1-30 segundos, por ejemplo 10-20 segundos, o entre 75°C y 95°C durante 10-30 minutos. Dicho intervalo de tiempo se refiere al que pasa el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) sometido a la temperatura indicada. Nótese que el tiempo de aplicación de calor puede ser distinto dependiendo de la naturaleza y cantidad de la composición de *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) preparada y del diseño del aparato de calentamiento utilizado.

10 El tratamiento térmico se puede realizar a la presión atmosférica normal, pero también bajo presión elevada. Los intervalos típicos de presión son de 1 hasta 50 bar, preferiblemente de 1-10 bar, con mayor preferencia de 2 a 5 bar. La presión ideal que deba aplicarse dependerá de la naturaleza de la composición que lleva los microorganismos y de la temperatura usada.

15 Si las composiciones que llevan *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) se tratan térmicamente de cualquier modo, p.ej. antes de ser envasadas y distribuidas, puede ser preferible usar este tratamiento térmico para inactivar el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618).

20 Normalmente, las composiciones que contienen *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) se pueden someter a un tratamiento breve a temperatura elevada (HTST), a una pasteurización instantánea o a un tratamiento a temperatura ultra elevada (UHT).

25 Un tratamiento UHT es un proceso a temperatura ultra elevada o un tratamiento ultratérmico (ambos abreviados como UHT) que comporta la esterilización al menos parcial de una composición, calentándola durante un breve periodo de tiempo, de 1-10 segundos aproximadamente, a una temperatura superior a 135°C (275°F), que es la temperatura necesaria para matar esporas bacterianas en la leche. Por ejemplo, procesando la leche de este modo a temperaturas mayores a 135°C, la carga bacteriana puede reducirse en el tiempo necesario de tratamiento (hasta 30 2-5 s), lo cual permite operar a flujo continuo.

Hay dos tipos principales de sistemas UHT: directos e indirectos. En el sistema directo los productos se tratan por inyección de vapor o infusión en vapor, mientras que en el sistema indirecto los productos se tratan térmicamente mediante el uso de intercambiadores de calor de placas, de tubos o de superficie raspada. Las combinaciones de sistemas UHT se pueden aplicar en cualquier etapa o en varias etapas del proceso de preparación del producto.

40 Un tratamiento HTST (temperatura elevada/tiempo breve) se define del modo siguiente: método de pasteurización diseñado para conseguir una reducción de 5-log, matando el 99,9999% del número de microorganismos viables en la leche, lo cual se considera adecuado para destruir casi todas las levaduras, mohos y bacterias de descomposición comunes y también para asegurar la destrucción adecuada de organismos patógenos corrientes resistentes al calor. En el proceso HTST la leche se calienta a 71,7°C (161°F) durante 15-20 segundos.

45 La pasteurización instantánea es un método de esterilización térmica de bebidas perecederas tales como zumos de frutas y hortalizas, cerveza y productos lácteos. Se efectúa antes del envasado para matar los microorganismos de descomposición, a fin de hacer los productos más seguros y alargar su tiempo de estabilidad al almacenamiento. El líquido se mueve en condiciones de flujo continuo controlado, mientras se somete a temperaturas de 71,5°C (160°F) a 74°C (165°F) durante 15 a 30 segundos.

50 Para los fines de la presente invención el término "tratamiento breve a temperatura elevada" incluye los tratamientos de tiempo corto a alta temperatura (HTST), los tratamientos UHT y la pasteurización instantánea, los tratamientos a baja temperatura durante largo tiempo, por ejemplo.

55 Las composiciones de la presente invención comprenden *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) en cantidad suficiente para tratar, al menos en parte, infecciones y trastornos relacionados con el sistema inmunitario y/o sus complicaciones. Una cantidad adecuada a tal fin se define como "una dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para esta finalidad dependen de varios factores conocidos de los especialistas en la materia, tales como la gravedad del trastorno y el peso y estado general de salud del consumidor, y del efecto en la matriz alimenticia.

60 Para las aplicaciones profilácticas, las composiciones según la presente invención se administran al consumidor susceptible o en riesgo de padecer trastornos relacionados con el sistema inmunitario, en una cantidad suficiente para reducir, al menos parcialmente, el riesgo de desarrollar dichos trastornos. Esta cantidad se como "una dosis profilácticamente efectiva". De nuevo las cantidades exactas dependen de varios factores específicos del paciente, como su peso y estado de salud, y del efecto en la matriz alimenticia.

65

## ES 2 559 008 T3

Los expertos en la materia podrán ajustar la dosis terapéuticamente efectiva y/o la dosis profilácticamente efectiva de manera apropiada.

5 La composición de la presente invención contiene *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicante en una dosis terapéuticamente efectiva y/o profilácticamente efectiva.

Normalmente la dosis terapéuticamente efectiva y/o la dosis profilácticamente efectiva están comprendidas en el intervalo aproximado de 0,005 mg - 1000 mg de L1 por dosis diaria.

10 Respecto a las proporciones numéricas, el contenido de *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) en la composición puede estar comprendido entre  $10^4$  y  $10^{12}$  ufc/g de composición seca. Dado que obviamente los microorganismos no replicantes no forman colonias, el dato debe entenderse como la cantidad de microorganismos no replicantes que se obtiene partiendo de  $10^4$  y  $10^{12}$  ufc/g de bacterias replicantes. Esto incluye microorganismos inactivados, no viables o muertos, o presentes en forma de fragmentos de pared celular o compuestos de pared celular o citoplasmáticos. En otras palabras, la cantidad de microorganismos que contiene la composición se expresa como la capacidad formadora de colonias (ufc) de dicha cantidad de microorganismos, como si todos ellos fueran vivos, sin tener en cuenta el hecho de que sean no replicantes, es decir inactivados o muertos, fragmentados o una mezcla de todos estos estados.

20 Por ejemplo, la composición conforme a la presente invención puede contener una cantidad de *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) correspondiente a  $10^4$  hasta  $10^{12}$  ufc/g por dosis diaria aproximadamente.

25 La composición según la presente invención puede contener aproximadamente 0,005 mg - 1000 mg de *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) por dosis diaria.

La composición de la presente invención puede ser de cualquier tipo. La composición puede ser de administración oral, enteral, parenteral (subcutánea o intramuscular), tópica u ocular, por inhalación, intrarrectal e intravaginal, por ejemplo.

30 Por consiguiente la composición de la presente invención se puede escoger del grupo formado por composiciones alimenticias, productos alimenticios – incluyendo comida de mascotas, bebidas, fórmulas de nutrición completa, suplementos nutricionales, neutraceuticos, aditivos alimentarios, composiciones farmacéuticas, composiciones cosméticas, composiciones de uso tópico y medicamentos.

35 Se pueden agregar prebióticos. Los prebióticos pueden favorecer el crecimiento de los probióticos antes de que se vuelvan no replicantes. Los prebióticos también pueden actuar sinérgicamente con bacterias probióticas viables que estén presentes en la composición y/o se añadan a ella.

40 El trastorno relacionado con el sistema inmunitario puede elegirse del grupo formado por infecciones, en particular bacterianas, víricas, fúngicas y/o parasitarias; inflamaciones; deficiencias de fagocitos; disfunción de la barrera epitelial o inmadurez del sistema inmunitario, SBID y combinaciones de los mismos.

45 En una forma de ejecución de la presente invención, la composición que contiene *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) se puede usar para tratar o prevenir infecciones microbianas como las de tipo vírico, fúngico y/o parasitario.

El trastorno relacionado con el sistema inmunitario también se puede elegir del grupo de desarreglos asociados a un nivel reducido de defensinas, en particular de la hBD2.

50 Además, en caso de emplear el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicante, el trastorno relacionado con el sistema inmunitario también se puede seleccionar del grupo de desarreglos asociados a un nivel reducido de la hBD1.

55 Tales trastornos se pueden seleccionar del grupo constituido por fibrosis quística, enfermedad reactiva de las vías respiratorias, infecciones pulmonares por fumar tabaco, asma, neumonía, rinitis, otitis, sinusitis, tuberculosis, enfermedad de Crohn (colon e ileon), colitis ulcerosa, inmadurez intestinal, gastritis y úlcera gástrica inducida por infección por *Helicobacter pylori*, diarrea infecciosa, enterocolitis necrosante, diarrea asociada a antibióticos, vaginosis bacteriana, VIH, virus del herpes simple, infección urinaria, dermatitis atópica, úlcera crónica, carcinoma, eczema atópico, quemaduras, amigdalitis, gingivitis, caries dental, queratitis en los ojos y combinaciones de ellos.

60 La composición de la presente invención se puede usar para estimular las defensas antimicrobianas endógenas.

Esto puede lograrse, por ejemplo, estimulando la expresión de la hBD2 endógena y – en caso de usar el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicante – potenciando además la expresión de la hBD1.

65

Los presentes inventores han encontrado que el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicante induce fuertemente la expresión de la hBD2 constitutiva; que el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicante, p.ej. tratado térmicamente, intensifica la expresión de la hBD2 más fuertemente incluso que su homólogo vivo; y que el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) tratado térmicamente también intensifica la expresión de la hBD1.

Por lo tanto el contenido de la presente invención también comprende un método para aumentar la efectividad del *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618), que es útil en el tratamiento o prevención de los trastornos relacionados con el sistema inmunitario e incluye la etapa de convertir el *B. longum* NCC 2705 en no replicante, p.ej. por tratamiento térmico.

El trastorno relacionado con el sistema inmunitario puede ser uno de los enumerados arriba, por ejemplo.

En particular el trastorno puede ser un desarreglo relacionado con un nivel reducido de  $\beta$ -defensinas.

En una forma de ejecución de la presente invención el método incluye una etapa de tratamiento térmico a por lo menos unos 70°C durante al menos unos 10 segundos.

Los expertos en la materia comprenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención aquí descritas, sin salirse del alcance de la presente invención tal como está revelada. En particular las características descritas para las composiciones de la presente invención se pueden aplicar a los usos y/o al método de la presente invención y viceversa.

Otras ventajas y características de la presente invención resultan evidentes en los ejemplos y figuras siguientes.

La figura 1 muestra que el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) tratado térmicamente a 120°C – 15 segundos induce *in vitro* el ARNm de la hBD2 en células epiteliales del intestino más fuertemente que otras cepas tratadas térmicamente. Se incubaron células T84 durante 4 h con cepas tratadas térmicamente. La expresión genética de la hBD2 se analizó por PCR en tiempo real. Los datos representan las medias  $\pm$  esm normalizadas respecto a la expresión basal de las células no estimuladas.

La figura 2 muestra que el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) tratado térmicamente a 85°C – 20 minutos presenta la inducción más fuerte de la hBD2 (A) y de la hBD1 (B). Se estimularon células T84 durante 4 h con el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) vivo y el tratado térmicamente a 120°C – 15 segundos o a 85°C – 20 minutos. La expresión genética de la hBD2 se analizó por PCR en tiempo real. Los datos representan las medias  $\pm$  esm normalizadas respecto a la expresión basal de las células no estimuladas.

Ejemplos:

Protocolo experimental:

Se emplearon células T84 del pasaje 30-40 y se cultivaron en medio esencial modificado por Dulbecco/F-12 (Sigma D 6421) que contenía 5% de suero fetal bovino (SFB) (Amined BioConcept) y glutamina 2 mM. Las células se sembraron a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos y se cultivaron como monocapas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> - 95% de aire. Las células cultivadas hasta 1 semana tras la confluencia se incubaron con suero y medio libre de antibióticos durante al menos 12 h. Esta etapa era necesaria para eliminar la expresión de defensinas inducida por el suero y evitar cualquier influencia de los antibióticos en los probióticos y en la respuesta inmunitaria celular. Las células se siguieron cultivando durante 4 h con probióticos o con cepas tratadas térmicamente. Terminado el tiempo de incubación las células se lavaron con PBS y se extrajeron con reactivo de aislamiento TriPure<sup>®</sup> según el protocolo del proveedor. La expresión genética de la hBD1 y la hBD2 humanas en las células así tratadas se midió por PCR cuantitativa.

Las cepas bacterianas utilizadas en este experimento son *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618), *B. lactis* (NCC 2818, número de depósito CNCM 1-3446), *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225), *L. paracasei* (ST11, NCC 2461, número de depósito I-2116). Estas cepas se ensayaron vivas o tratadas térmicamente a 120°C – 15 segundos o a 85°C - 20 minutos.

Resultados:

La expresión del ARNm de la hBD2 fue intensificada por todas las cepas estudiadas, tratadas térmicamente (120°C – 15 segundos), pero el *B. longum* (NCC2705) (número de depósito CNCM I-2618) indujo un efecto mucho más fuerte que otras cepas tratadas térmicamente (figura 1).

Además los datos expuestos demuestran que el tratamiento térmico del *B. longum* (NCC2705) (número de depósito CNCM I-2618) mejora su efecto en la expresión del ARNm de la hBD2. Efectivamente, el *B. longum* (NCC2705) (número de depósito CNCM I-2618) inactivado térmicamente a 120°C – 15 segundos o a 85°C - 20 minutos es más eficiente que la cepa viva (figura 2).

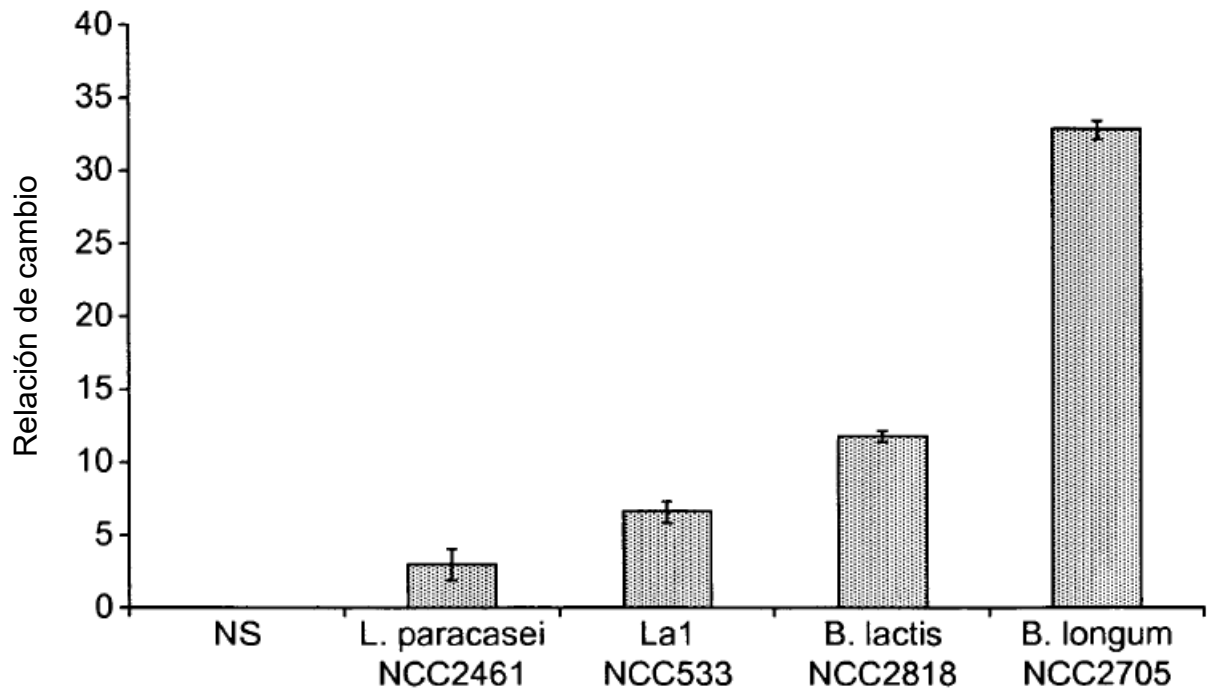
Además la inactivación del *B. longum* (NCC2705) (número de depósito CNCM I-2618) a baja temperatura (85°C) durante largo tiempo intensifica fuertemente no solo la expresión del ARNm de la hBD2 sino también la expresión del ARNm de la hBD1 (figura 2A y B).



## REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) para emplear en el tratamiento o en la prevención de infecciones y trastornos relacionados con el sistema inmunitario, en la cual los *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) se convierten al menos parcialmente en no replicantes por inactivación térmica mediante un tratamiento a por lo menos 70°C aproximadamente, seleccionando el trastorno relacionado con el sistema inmunitario del grupo formado por infecciones, en particular bacterianas, víricas, fúngicas y/o parasitarias; sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SBID) y combinaciones de los mismos; o bien seleccionando el trastorno relacionado con el sistema inmunitario del grupo de desarreglos asociados a un nivel reducido de hBD2, escogidos entre fibrosis quística, enfermedad reactiva de las vías respiratorias, infecciones pulmonares por fumar tabaco, asma, neumonía, rinitis, otitis, sinusitis, tuberculosis, enfermedad de Crohn (colon e íleon), colitis ulcerosa, inmadurez intestinal, gastritis y úlcera gástrica inducida por infección por *Helicobacter pylori*, diarrea infecciosa, enterocolitis necrosante, diarrea asociada a antibióticos, vaginosis bacteriana, VIH, virus del herpes simple, infección urinaria, dermatitis atópica, úlcera crónica, carcinoma, eczema atópico, quemaduras, amigdalitis, gingivitis, caries dental, queratitis en los ojos.
2. Composición para emplear según la reivindicación 1, en la cual el tratamiento térmico se efectúa durante al menos 10 segundos.
3. Composición para emplear según una de las reivindicaciones anteriores, en la cual los *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) se convierten en no replicantes entre 110°C y 140°C durante 10-20 segundos o entre 75°C y 95°C durante 10-30 minutos.
4. Composición para emplear según una de las reivindicaciones anteriores, que contiene una cantidad de *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicante correspondiente a  $10^4$  hasta  $10^{12}$  ufc/g por dosis diaria aproximadamente.
5. Composición para emplear según una de las reivindicaciones anteriores, que contiene aproximadamente 0,005 mg - 1000 mg de *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) no replicante por dosis diaria.
6. Composición para emplear según una de las reivindicaciones anteriores, en la cual al menos el 95% de los *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) son no replicantes, preferiblemente todos los *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) son no replicantes.
7. Composición para emplear según una de las reivindicaciones anteriores, seleccionada del grupo formado por composiciones alimenticias, productos alimenticios, incluyendo comida de mascotas, bebidas, fórmulas nutricionales, fórmulas alimenticias, productos neutracéuticos, aditivos alimentarios, composiciones farmacéuticas, composiciones cosméticas, composiciones de uso tópico y medicamentos.
8. Composición para emplear según una de las reivindicaciones anteriores, destinada a estimular las defensas antimicrobianas endógenas y/o la expresión de la hBD1 y hBD2 endógenas.
9. Método para incrementar la efectividad del *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618), útil en el tratamiento o en la prevención de los trastornos relacionados con el sistema inmunitario, que incluye la etapa de convertir el *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) en no replicante mediante una etapa de tratamiento térmico a por lo menos unos 75°C durante al menos unos 10 segundos, seleccionando el trastorno relacionado con el sistema inmunitario del grupo formado por infecciones, en particular bacterianas, víricas, fúngicas y/o parasitarias; sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SBID) y combinaciones de los mismos; o bien seleccionando el trastorno relacionado con el sistema inmunitario del grupo de desarreglos asociados a un nivel reducido de hBD2, escogidos entre fibrosis quística, enfermedad reactiva de las vías respiratorias, infecciones pulmonares por fumar tabaco, asma, neumonía, rinitis, otitis, sinusitis, tuberculosis, enfermedad de Crohn (colon e íleon), colitis ulcerosa, inmadurez intestinal, gastritis y úlcera gástrica inducida por infección por *Helicobacter pylori*, diarrea infecciosa, enterocolitis necrosante, diarrea asociada a antibióticos, vaginosis bacteriana, VIH, virus del herpes simple, infección urinaria, dermatitis atópica, úlcera crónica, carcinoma, eczema atópico, quemaduras, amigdalitis, gingivitis, caries dental, queratitis en los ojos.
10. Composición que contiene *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618), en la cual al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%, con mayor preferencia al menos el 99%, idealmente al menos el 99,9% o el 100% de los *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) son no replicantes, en la cual los *B. longum* NCC 2705 (número de depósito CNCM I-2618) se han hecho no replicantes, al menos en parte, por inactivación térmica mediante un tratamiento a por lo menos 70°C aproximadamente.

**ARNm de la HBD2**



**FIG. 1**

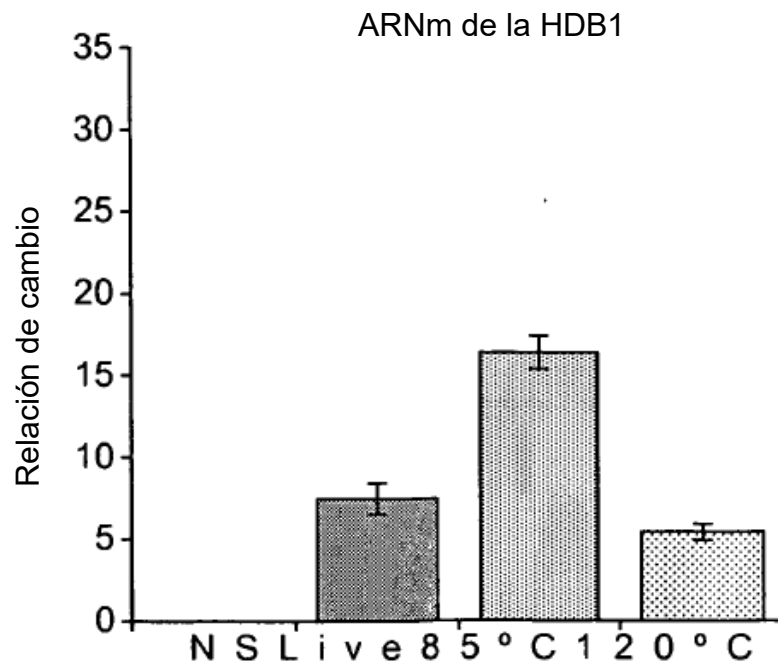
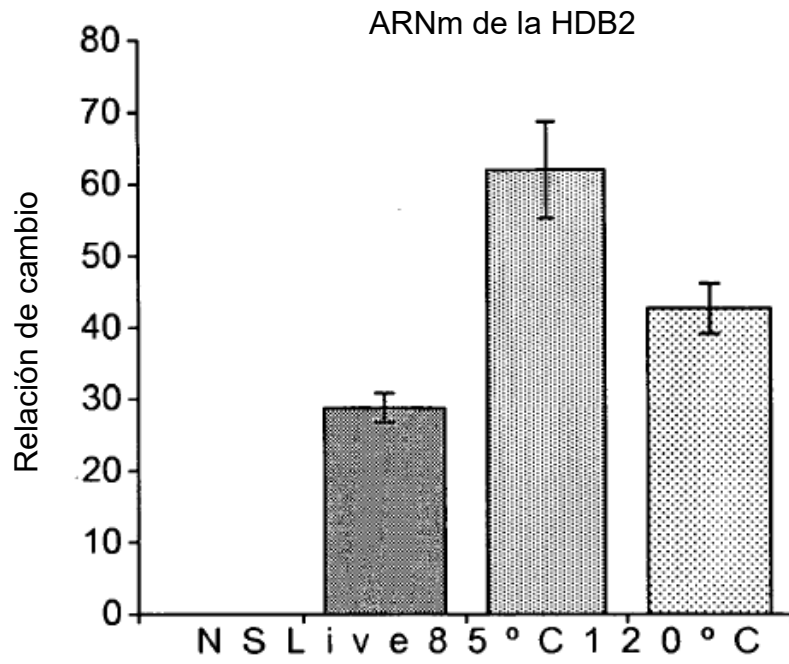


FIG. 2