

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 156**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/745** (2015.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2006 PCT/US2006/010418**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2006 WO06113035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2006 E 06739278 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 1868623**

54 Título: **Uso de LGG en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de alergias respiratorias**

30 Prioridad:

**15.04.2005 US 106792**  
**03.06.2005 US 144287**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.01.2017**

73 Titular/es:

**MJN U.S. HOLDINGS LLC (100.0%)**  
**2701 Patriot Boulevard, 4th Floor**  
**Glenview, IL 60026, US**

72 Inventor/es:

**HERZ, UDO;**  
**RENZ, HARALD;**  
**BLUEMER, NICOLE y**  
**GARN, HOLGER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 599 156 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

Uso de LGG en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de alergias respiratorias  
Antecedentes de la invención

5

Antecedentes de la invención

(1) Campo de la invención

10

La presente invención se refiere generalmente a un uso de LGG ATCC53103 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de alergias respiratorias en un sujeto antes de la sensibilización alérgica del sujeto, prenatal o postnatal.

15

(2) Descripción de la técnica relacionada

La alergia se define como una "hipersensibilidad anormal a una sustancia que normalmente se tolera y generalmente se considera inofensiva." Los síntomas de las alergias pueden variar desde una secreción nasal hasta un shock anafiláctico. Casi 50 millones de estadounidenses sufren de enfermedad alérgica, y la incidencia de estas enfermedades va en aumento.

20

Existen dos fases básicas implicadas en la respuesta alérgica. La primera etapa implica el desarrollo de la fase temprana de una respuesta de hipersensibilidad de tipo inmediata a los alérgenos. La primera vez que un alérgeno se encuentra con el sistema inmunológico, no se produce reacción alérgica. En lugar de ello, el sistema inmunológico se prepara para futuros encuentros con el alérgeno. Los macrófagos, que son células depuradoras, rodean y rompen el alérgeno invasor. Los macrófagos muestran después los fragmentos de alérgenos en sus paredes celulares a los linfocitos T, que son los principales orquestadores de la reacción inmunológica del cuerpo.

25

Esta señal cognitiva además de diversas señales no cognitivas (por ejemplo, citocinas) activan las células T vírgenes e indican a la diferenciación de las células T en subpoblaciones efectoras de células T. Los elementos claves de la cascada alérgica son las células T del fenotipo Th-2 (TH-2). Las células T de tipo TH-2 se caracterizan por la secreción de diversas citocinas que incluyen la interleuquina-4 (IL-4), IL-5 e IL-13. Las citocinas IL-4 e IL-13 después activan los linfocitos B que producen anticuerpos de la subclase E (IgE). Los anticuerpos IgE se dirigen contra el alérgeno particular. La interacción de anticuerpos IgE específicos en la superficie de las células efectoras (mastocitos y basófilos) con un alérgeno desencadena la fase temprana de las respuestas de hipersensibilidad de tipo inmediatas.

30

Esta activación de mastocitos usualmente se produce a los pocos minutos después de la segunda exposición a un alérgeno. Los anticuerpos IgE en los mastocitos, producidos durante la fase de sensibilización, reconocen al alérgeno y se unen al invasor. Una vez que el alérgeno se une al receptor, los gránulos en los mastocitos liberan sus contenidos. Estos contenidos, o mediadores, son sustancias proinflamatorias tales como histamina, factor activador de plaquetas, prostaglandinas, citocinas y leucotrienos. Estos mediadores desencadenan en realidad el ataque de la alergia. La histamina estimula la producción de moco y provoca enrojecimiento, hinchazón e inflamación. Las prostaglandinas estrechan las vías respiratorias y dilatan los vasos sanguíneos.

35

La segunda fase de la respuesta inmunológica alérgica se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias, tales como eosinófilos, en las vías respiratorias después de una exposición a alérgeno. Un enlace importante entre la sensibilización y la inflamación se representa por las células T que secretan mediadores no sólo implicados en la síntesis de IgE, sino también responsables del reclutamiento, la activación y la supervivencia de los eosinófilos. Los mastocitos de tejidos y células vecinas producen mensajeros químicos que indican a basófilos, eosinófilos y otras células circulantes a migrar dentro de ese tejido y ayudar a combatir el material extraño. Los eosinófilos secretan sustancias químicas propias que sustentan la inflamación, provocan daño a los tejidos, y reclutan aún más células inmunológicas. Esta fase puede producirse en cualquier lugar entre varias horas y varios días después de la exposición al alérgeno y puede durar horas e incluso días.

40

La alergia respiratoria es un tipo particular de alergia que afecta el tracto respiratorio. El revestimiento de las vías respiratorias desde la nariz hasta los pulmones es similar en estructura y frecuentemente se afecta de manera similar por el proceso alérgico. Por lo tanto, un alérgeno que afecta a la nariz o a los senos también podría afectar a los pulmones.

45

Por ejemplo, la rinitis alérgica, también conocida como fiebre del heno, es provocada por reacciones alérgicas de las membranas de la mucosa en la nariz y de las vías respiratorias a los alérgenos en el aire. Los síntomas de la rinitis alérgica frecuentemente incluyen picazón en nariz, garganta y ojos y estornudos excesivos. La congestión o la secreción nasal frecuentemente siguen.

50

Como los alérgenos en un área del tracto respiratorio pueden afectar otras áreas del tracto respiratorio, la rinitis en los conductos nasales puede conducir al asma, que es una enfermedad mucho más grave que se produce en los pulmones. El asma se caracteriza por el desarrollo de hiperreactividad en las vías respiratorias, falta de aliento, respiración

55

sibilante en la exhalación, tos seca y una sensación de opresión en el pecho. La exposición repetida al alérgeno puede mantener la respuesta inmunológica inflamatoria en las vías respiratorias, lo que resulta en una remodelación de las vías respiratorias, comúnmente conocido como asma crónica. No todas las personas con rinitis alérgica desarrollarán los síntomas del asma, pero un número significativo, especialmente aquellos con alergias recurrentes, no tratadas, mostrarán los cambios de inflamación pulmonar. Aproximadamente el cuarenta por ciento de las personas con rinitis alérgica desarrollará en realidad asma verdadera.

Si la inflamación nasal que acompaña a la rinitis alérgica alcanza los senos, el resultado puede ser una infección incómoda llamada sinusitis, o rinosinusitis, en la que los senos no pueden vaciarse de bacterias. Los síntomas incluyen congestión nasal, secreción nasal, dolor de garganta, fiebre, dolor de cabeza, fatiga y tos, así como también dolor en la frente, detrás de las mejillas, e incluso dientes y mandíbula doloridos.

Las alergias respiratorias son una de las afecciones más comunes en la infancia. Como con los adultos, es más probable que las alergias respiratorias en los niños aparezcan en la forma de rinitis alérgica y asma.

La prevención de las alergias respiratorias es especialmente importante en lactantes y niños pequeños, ya que parece que la sensibilización alérgica temprana a alérgenos se asocia con un retraso en la maduración de las respuestas inmunológicas normales. Además, la sensibilización alérgica generalmente se considera como la primera etapa en el desarrollo de la enfermedad atópica. Baena-Cagnani, *Role of Food Allergy in Asthma in Childhood*, *Allergy. Clin. Immun.* 1(2):145-149 (2001). Frecuentemente, el asma que comienza temprano en la vida se asocia con atopia, por lo tanto la sensibilización alérgica parece jugar un papel importante en el asma persistente también. Martínez, F., *Development of Wheezing Disorders and Asthma in Preschool Children*, *Pediatr.* 109:362-367 (2002).

No sólo existe una fuerte asociación entre la sensibilización alérgica y el asma, sino que la asociación parece ser dependiente de la edad. Aunque pocos niños se vuelven sensibles a alérgenos durante los primeros años de vida, la gran mayoría de los que se vuelven sensibles durante este periodo desarrollan síntomas similares al asma más tarde en la vida. Martínez, F., *Viruses and Atopic Sensitization in the First Years of Life*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162:S95-S99 (2000). Por lo tanto, es importante encontrar formas de prevenir la sensibilización temprana a alérgenos y prevenir las alergias respiratorias más tarde en la vida.

Existe evidencia creciente de que muchos aspectos de la salud y la enfermedad se determinan no sólo durante la infancia, sino también durante el embarazo. Esto es especialmente cierto con la enfermedad alérgica, donde las respuestas inmunológicas en el nacimiento implican la exposición intrauterina como un evento primario de sensibilización. Por ejemplo, las células T específicas a alérgenos ya están presentes en el nacimiento y la sensibilización temprana a los alérgenos alimentarios se identifica como predictores para el desarrollo posterior de las alergias respiratorias. Illi, y otros, *The Natural Course of Atopic Dermatitis from Birth to Age 7 Years and the Association with Asthma*, *Clin. Exp. Allergy* 27:28-35 (1997). Además, el desarrollo del pulmón comienza muy temprano después de la fertilización y continúa por al menos dos o tres años después del nacimiento. Por lo tanto, el desarrollo prenatal y postnatal de las vías respiratorias son importantes en la patogénesis de la alergia respiratoria en lactantes y niños.

Además se ha demostrado que el feto humano desarrolla células B productoras de IgE temprano en la gestación y es capaz de producir anticuerpos IgE en respuesta a estímulos antigénicos apropiados de una manera análoga a las respuestas de IgM bien reconocidas que se observan en varias infecciones prenatales. Weil, G., y otros, *Prenatal Allergic Sensitization to Helminth Antigens in Offspring of Parasite-Infected Mothers*, *J. Clin. Invest.* 71:1124-1129 (1983). Esto ilustra además la importancia de prevenir la sensibilización alérgica prenatal y postnatal a alérgenos respiratorios.

Los medicamentos tradicionales para las alergias respiratorias incluyen antihistamínicos, esteroides tópicos nasales, descongestionantes, y solución de cromolina. Como una alternativa a los medicamentos tradicionales, los probióticos han surgido como tratamientos posibles para ciertos tipos de alergias.

Las bacterias probióticas son microorganismos vivos que ejercen efectos beneficiosos en la salud del huésped. *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*, que son habitantes normales del intestino sano, son especies comunes de probióticos. Desafortunadamente, existen muy pocos estudios publicados sobre los efectos clínicos de la suplementación de probióticos en los lactantes. Agostoni, C., y otros, *Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition*, *J. Pediatr. Gastro. Nutr.* 38:365-74 (2004).

La solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20040208863 otorgada a Versalovic, y otros se dirige a un compuesto que tiene actividad anti-inflamatoria y se secreta a partir de bacterias ácido lácticas. La solicitud describe el uso de *Lactobacillus GG* (LGG) para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias. La referencia sin embargo, se enfoca en los modelos adultos y no describe o sugiere que la administración de LGG durante el embarazo o la lactancia sería beneficiosa.

La patente de los Estados Unidos núm. 6,506,380 otorgada a Isolauri, y otros, describe un método para suprimir las reacciones de hipersensibilidad inducidas por alimentos en pacientes que sufren de alergia alimentaria mediante la administración a los mismos de un probiótico. La referencia no describe, sin embargo, el uso de probióticos para tratar

alergias respiratorias. Además, aunque la patente discute el tratamiento de lactantes con probióticos, no describe la importancia de tratar prenatal y postnatalmente. El documento WO 01/97822 se relaciona con la prevención de enfermedades atópicas, en particular la prevalencia del eccema atópico, en un lactante mediante la administración prenatal y postnatal de LGG y *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

5  
 10  
 15  
 Diversos estudios se han enfocado en la administración prenatal y postnatal de los probióticos para prevenir algunas alergias en lactantes y niños. Por ejemplo, un estudio concluye que los probióticos, administrados durante el embarazo y la lactancia, podrían conferir protección de eccema atópico al lactante. Rautava, S, y otros, Probiotics During Pregnancy and Breast-Feeding Might Confer Immunomodulatory Protection Against Atopic Disease in the Infant, *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 119-121 (2002). Aunque el estudio encontró que un menor número de lactantes en el grupo probiótico desarrollaron eccema atópico que los del grupo placebo, el estudio concluyó que la administración de probióticos "no tuvo efecto sobre las correlaciones objetivo tradicionales de atopía y enfermedad atópica (es decir, los resultados de las pruebas de punción cutánea y anticuerpos IgE en suero)." Por lo tanto, debido a que los marcadores tradicionales de atopía no se afectaron por la suplementación probiótica, debe suponerse que la administración probiótica fue eficaz sólo para el eccema atópico y no para todas las alergias.

20  
 Del mismo modo, un estudio del 2001 concluyó que los probióticos pueden prevenir el eccema atópico, pero que "la concentración de IgE total y las frecuencias de aumento de las concentraciones de IgE específicas de antígeno y de las reacciones positivas en las pruebas de punción cutánea fueron muy similares entre los grupos de probióticos y de placebo." Kalliomaki, M., Probiotics in Primary Prevention of Atopic Disease: a Randomised Placebo-Controlled Trial, *Lancet* 357:1076-79 (2001). Una vez más, estos resultados sugieren que la administración de probióticos, aunque es eficaz para el eccema atópico, no sería necesariamente eficaz para otros tipos de alergias.

25  
 Resumen de la invención

Brevemente, la presente invención se dirige al uso novedoso de LGG ATCC53103 en la fabricación de un medicamento para prevenir el desarrollo de alergias respiratorias y reducir la producción de anticuerpos IgE en suero en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de *Lactobacillus rhamnosus* GG antes de la sensibilización alérgica del sujeto.

30  
 La presente invención describe además un uso novedoso de LGG en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de alergias respiratorias en un sujeto.

35  
 En otro aspecto la presente invención describe un uso novedoso de LGG en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la liberación de una o más citocinas proinflamatorias en un sujeto.

Además, la presente invención describe un uso novedoso de LGG en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la producción de anticuerpos IgE en suero en un sujeto.

40  
 La presente invención describe además un uso novedoso de LGG en la fabricación de un medicamento para aumentar la producción de anticuerpos IgA en suero en un sujeto.

45  
 50  
 Entre las diversas ventajas que se logran con la presente invención, se encuentra que el sujeto se beneficia de la reducción o prevención de la inflamación inducida por alergia del pulmón o la vías respiratorias, que incluye una reducción de la inflamación de los tejidos de las vías respiratorias y de la inflamación del lumen de las vías respiratorias. La invención proporciona además una disminución de la producción de moco y un ensanchamiento de las vías respiratorias. La invención proporciona además una reducción o prevención de la liberación de citocinas proinflamatorias y de anticuerpos IgE en suero así como también un aumento de la producción de IgA en suero. Estos beneficios fueron sorprendentes e inesperados, ya que estudios similares proporcionan resultados contrarios.

Breve descripción de las figuras

55  
 Para una comprensión más completa de la presente invención, ahora se hace referencia a las siguientes descripciones tomadas junto con los dibujos adjuntos.

La Figura 1 ilustra el protocolo utilizado durante la presente invención.

La Figura 2 ilustra la detección de LGG en las heces de ratones tratados con LGG frente al control.

60  
 La Figura 3 ilustra las bacterias en las heces de ratones tratados con LGG frente al control.

La Figura 4 ilustra el efecto de LGG sobre IgE anti-OVA en suero, IgG1 anti-OVA en suero, e IgG2a anti-OVA en suero.

65  
 La Figura 5 ilustra el efecto de LGG sobre los niveles de anticuerpos IgA en suero.

La Figura 6 ilustra el efecto de LGG sobre varias citocinas proinflamatorias, IFN- $\gamma$  (Fig. A), MCP-1 (Fig. B), IL-10 (Fig. C), e IL-6 (Fig. D) en lactantes sensibilizados a OVA.

La Figura 7 ilustra el efecto de LGG sobre la distribución de células mononucleares en las vías respiratorias alérgicas.

La Figura 8 ilustra la supresión de la producción de anticuerpos específicos de la leche de vaca.

La Figura 9 ilustra la evaluación de la función efectora inmunológica de anticuerpos específicos de la leche de vaca mediante la prueba de anafilaxia cutánea pasiva y el ensayo de liberación de proteasa-1 en mastocitos.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

Definiciones

El término "probiótico" significa un microorganismo que ejerce efectos beneficiosos en la salud del huésped.

El término "prebiótico", como se usa en la presente descripción, significa un ingrediente alimenticio no digerible que estimula el crecimiento y/o la actividad de los probióticos.

El término "sujeto" significa cualquier mamífero, preferentemente un ser humano.

Como se usa en la presente descripción, el término "tratar" significa aliviar, mejorar o curar una enfermedad, trastorno, o síntoma de una enfermedad o afección.

El término "prevenir" significa detener o dificultar una enfermedad, trastorno, o síntoma de una enfermedad o afección a través de alguna acción.

Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad que resulta en una mejora o curación de la enfermedad, trastorno, o síntomas de la enfermedad o afección.

Los términos "administración prenatal" o "administrar prenatalmente" significan cualquier administración a la madre embarazada de un sujeto por nacer.

Los términos "administración postnatal" o "administrar postnatalmente" significan cualquier administración a un sujeto desde el momento del nacimiento hasta aproximadamente 1 año de vida.

Como se usa en la presente descripción, el término "fórmula infantil" significa una composición que satisface los requerimientos nutricionales de un lactante al ser un sustituto de la leche humana. En los Estados Unidos, los contenidos de una fórmula infantil se dictan por las regulaciones federales que se exponen en 21 C.F.R. Secciones 100, 106, y 107. Estas regulaciones definen los niveles de macronutrientes, vitaminas, minerales, y otros ingredientes en un esfuerzo para estimular las propiedades nutricionales y otras propiedades de la leche materna humana.

Inventión

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto un uso novedoso de LGG ATCC53103 en la fabricación de un medicamento para prevenir el desarrollo de alergias respiratorias y reducir la producción de anticuerpos IgE en suero en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 antes de la sensibilización alérgica del sujeto. De acuerdo con la invención, la administración prenatal y/o postnatal de LGG a un sujeto, antes de nacer y durante la infancia puede prevenir o tratar el desarrollo de alergias respiratorias más tarde en la vida.

LGG es una cepa probiótica aislada a partir de la flora intestinal sana de humanos. Se describió en la patente de los Estados Unidos núm. 5,032,399 otorgada a Gorbach, y otros, que LGG es resistente a la mayoría de los antibióticos, estable en presencia de ácido y bilis, y se une con avidéz a las células de la mucosa del tracto intestinal humano. Esta sobrevive durante 1-3 días en la mayoría de los individuos y hasta 7 días en el 30 % de los sujetos. Además de su capacidad de colonización, LGG también afecta beneficiosamente la respuesta inmunológica de la mucosa. LGG se deposita en la autoridad depositaria Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de acceso ATCC 53103.

En el uso de la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de LGG puede corresponder a entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^{12}$  ufc/L/kg/día. En otra modalidad, la presente invención comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^9$  ufc/L/kg/día de LGG. En aún otra modalidad, la presente invención comprende la administración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/L/kg/día de LGG.

La forma de administración de LGG en el uso de la invención no es crítica, siempre y cuando se administre una cantidad terapéuticamente eficaz. Para la administración prenatal, la LGG puede administrarse a la madre embarazada del sujeto por nacer y puede impartirse de esta manera al sujeto por nacer. La administración prenatal puede administrarse a la

madre en la forma de un suplemento. Por ejemplo, la LGG puede ingerirse en la forma de una píldora, tableta, cápsula, comprimido oblongo, polvo, líquido o gel. En esta modalidad del uso, un suplemento de LGG puede ingerirse en combinación con otros suplementos nutricionales, tales como vitaminas.

5 En otra modalidad, la LGG administrada prenatalmente puede encapsularse en una matriz de azúcar, grasa, o polisacárido para aumentar aún más la probabilidad de sobrevivencia bacteriana. Las composiciones de la presente invención pueden proporcionarse además en una forma adecuada para el consumo seleccionadas del grupo que consiste en bebida, leche, yogur, zumo de frutas, bebida a base de fruta, tableta masticable, galleta, galletica, o una combinación de estos.

10 Si, durante el primer año de vida, el sujeto se alimenta con leche materna, la administración postnatal de LGG puede ser a través de la leche materna de la madre. En esta modalidad, la madre puede continuar la suplementación de LGG durante el período de tiempo que ella amamanta, transfiriendo de esta manera una cantidad eficaz de LGG a su bebé a través de la leche materna.

15 Si, durante el primer año de vida, el sujeto se alimenta con fórmula, o si la madre complementa la lactancia materna con la alimentación con fórmula, la LGG puede complementarse en la fórmula infantil que se da después al sujeto. Esto, también, es un uso para la administración postnatal de la LGG.

20 En una modalidad, la fórmula infantil para el uso en la presente invención es nutricionalmente completa y contiene tipos y cantidades adecuadas de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. La cantidad de lípidos o grasas puede variar típicamente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 7 g/100 kcal. La cantidad de proteínas puede variar típicamente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 g/100 kcal. La cantidad de carbohidratos puede variar típicamente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 12 g/100 kcal. Las fuentes de proteínas pueden ser cualquiera de las usadas en la técnica, por ejemplo, leche sin grasa, proteína de suero de la leche, caseína, proteína de soja, proteína hidrolizada, aminoácidos, y similares. Las fuentes de carbohidratos pueden ser cualquiera de las usadas en la técnica, por ejemplo, lactosa, glucosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón, sólidos de jarabe de arroz, y similares. Las fuentes de lípidos pueden ser cualquiera de las usadas en la técnica, por ejemplo, aceites vegetales tales como aceite de palma, aceite de soja, palmoleína, aceite de coco, aceite triglicérido de cadena media, aceite de girasol alto en oleico, aceite de cártamo alto en oleico, y similares.

25 30 Convenientemente, puede usarse la fórmula infantil comercialmente disponible. Por ejemplo, Enfamil®, Fórmula para Prematuros Enfamil®, Enfamil® con hierro, Lactofree®, Nutramigen®, Pregestimil®, y ProSobee® (disponibles en Mead Johnson & Company, Evansville, IN, Estados Unidos) pueden complementarse con niveles adecuados de LGG y usarse en la práctica del uso de la invención.

35 Como alternativa a una fórmula infantil, la LGG administrada postnatalmente puede administrarse como un suplemento no integral a la alimentación con fórmula. Por ejemplo, LGG puede ingerirse en la forma de una píldora, cápsula, comprimido oblongo, polvo, líquido o gel. En esta modalidad del uso, un suplemento de LGG puede ingerirse en combinación con otros suplementos nutricionales, tales como vitaminas.

40 En otra modalidad, la LGG se encapsula en una matriz de azúcar, grasa o polisacárido para aumentar aún más la probabilidad de sobrevivencia bacteriana. Las composiciones de la presente invención pueden proporcionarse además en una forma adecuada para lactantes seleccionados del grupo que consiste en fórmula de seguimiento, bebida, leche, yogur, zumo de frutas, bebida a base de frutas, tableta masticable, galleta, galletica, o una combinación en estos.

45 En una modalidad del uso de la invención, la administración postnatal de LGG continúa por al menos 3 meses. En otra modalidad de la invención, la administración postnatal de LGG continúa por al menos 6 meses. En aún otra modalidad de la invención, la administración postnatal de LGG continúa por al menos 12 meses. En una modalidad particular de la invención, la administración postnatal de LGG continúa indefinidamente.

50 En una modalidad de la invención, la LGG administrada prenatalmente o postnatalmente puede combinarse con uno o más probióticos adicionales. Cualquier probiótico conocido en la técnica será aceptable en esta modalidad. En una modalidad particular, el probiótico se selecciona del grupo que consiste en Lactobacillus y Bifidobacterium.

55 En otra modalidad de la invención, la LGG administrada prenatalmente o postnatalmente puede combinarse con uno o más prebióticos. Cualquier prebiótico conocido en la técnica será aceptable en esta modalidad. Los prebióticos de la presente invención pueden incluir lactulosa, galacto-oligosacárido, fructo-oligosacárido, isomalto-oligosacárido, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, xilo-oligosacárido, y gentio-oligosacáridos.

60 En un uso de la presente invención, la administración prenatal y/o postnatal de LGG previene o trata el desarrollo de rinitis alérgica, asma o sinusitis.

65 En otro uso de la presente invención, la administración prenatal y/o postnatal de LGG previene o trata la inflamación inducida por alergia en el pulmón y las vías respiratorias de un sujeto. Específicamente, el uso de la invención puede

prevenir o tratar la inflamación del tejido de las vías respiratorias, la inflamación del lumen de las vías respiratorias, disminuir la producción de moco, o ensanchar la vía respiratoria.

5 En aún otro uso de la presente invención, la administración prenatal y/o postnatal de LGG reduce o previene la liberación de una o más citocinas proinflamatorias. Como se usa en la presente descripción, las citocinas "proinflamatorias" incluyen las conocidas en la técnica por estar implicadas en la regulación de reacciones inflamatorias. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-6 e IL-10.

10 En una modalidad particular de la invención, la administración prenatal y/o postnatal de LGG previene o reduce la producción de anticuerpos IgE en suero en sujetos. En otra modalidad, la administración prenatal y/o postnatal de LGG aumenta la producción de anticuerpos IgA en suero en sujetos.

15 Los siguientes ejemplos describen varias modalidades de la presente invención. En los ejemplos, todos los porcentajes se dan sobre una base en peso a menos que se indique de cualquier otra manera.

#### Ejemplo 1

20 Este ejemplo describe los materiales y métodos necesarios para demostrar el efecto de la administración prenatal de LGG sobre el desarrollo de alergias respiratorias y la inflamación en el pulmón y las vías respiratorias. Los ratones albinos, subcepa c (BALB/c) hembras de 6-8 semanas se obtuvieron de Harlaan Hinkelmann (Hannover, Alemania). Los mismos se mantuvieron en una dieta libre de Ovoalbúmina (OVA). Todos los procedimientos experimentales se aprobaron por el comité de ética animal.

#### Exposición prenatal a *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)

25 Los ratones hembra BALB/c recibieron 5 aplicaciones intragástricas (i.g.) de  $10^8$  unidades formadoras de colonias (ufc) de LGG liofilizado en un volumen de 200  $\mu$ l (reconstituida en solución salina amortiguada con fosfato (PBS)) en los días -10, -8, -6, -4 y -2 antes del apareamiento. Después del apareamiento y durante el período de gestación y lactancia, los ratones de todos los grupos se trataron por vía intragástrica con  $10^8$  ufc de LGG liofilizada en un volumen de 200  $\mu$ l cada segundo día). Los animales control de la misma edad, falsos tratados recibieron PBS en lugar de LGG (grupo control).

#### Exposición neonatal a OVA

35 A la edad de 25 días, y después de nuevo a la edad de 39 días, los ratones se sensibilizaron a OVA mediante dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 10  $\mu$ g de OVA (grado VI; Sigma, Deisenhofen, Alemania) emulsionada en 1.5 mg de Al(OH) $_3$  (Pierce, Rockford, Estados Unidos) en un volumen total de 200  $\mu$ l.

40 Para evaluar la inflamación de las vías respiratorias, los ratones se colocaron en una cámara de Plexiglas y se expusieron a OVA en aerosol (1 % peso/volumen diluida en PBS) durante 20 minutos en los días 44, 45, 46 y 47. La inflamación de las vías respiratorias se evaluó 24 horas después de la última exposición al aerosol de alérgeno.

La producción de citocinas y la respuesta de ambos anticuerpos IgE e IgA por los ratones sensibilizados a OVA se evaluó en el día 53.

#### 45 Detección de ADN de LGG en muestras de heces

50 Las muestras de heces (0.05 g) se pesaron asépticamente, se colocaron en tubos estériles y se homogeneizaron en 1.4 ml de amortiguador de lisis. La extracción del ADN genómico se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit para ADN en heces QIAamp, Qiagen). El ADN se amplificó mediante el uso del kit de PCR Hot-start (Qiagen) con pares de iniciadores específicos de LGG (LGG sentido: gagaagaatggtcggcagag y LGG antisentido: catttcaccgctacacatgg).

#### Descendencia: Exposición a OVA

55 A las edades de 25 y 39 días, la descendencia se sensibilizó a OVA mediante dos inyecciones i.p. de 10  $\mu$ g de OVA (grado VI; Sigma, Deisenhofen, Alemania) emulsionada en 1.5 mg de Al(OH) $_3$  (Pierce, Rockford, Estados Unidos) en un volumen total de 200  $\mu$ l. La respuesta de anticuerpos de los ratones sensibilizados a OVA se evaluó en el día 53.

60 A los días 44, 45, 46 y 47 se colocó un subgrupo de ratones en una cámara de Plexiglas y se expusieron a OVA en aerosol (1 % peso/volumen diluida en PBS) durante 20 minutos para evaluar la inflamación de las vías respiratorias.

#### Medición de los niveles en suero de anticuerpos específicos a OVA

65 Los niveles de IgG1, IgG2a específicos a OVA y los títulos de los anticuerpos se determinaron mediante la técnica de ELISA el día 53. Se revistieron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano para microtitulación (Greiner) con OVA (20  $\mu$ g/ml) diluida en amortiguador de carbonato para revestimiento 0.1 M, pH 8.2 (para IgG1) o PBS (para IgE,

IgG2a). Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C, se lavaron tres veces con amortiguador de lavado (PBS/0.1 % de Tween 20) y se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente mediante el uso de la solución de bloqueo (3 % de BSA/PBS). Después del lavado de las placas (3 veces), las muestras (diluidas en PBS/0.1 % de Tween 20) se añadieron y se incubaron a 4 °C durante la noche seguido de una incubación con anticuerpo monoclonal IgE, IgG2a o IgG1 anti-ratón conjugado a biotina (2.5 µg/ml, todos los anticuerpos de Pharmingen) durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se reveló con estreptavidina-peroxidasa (diluida 1:1000) durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y tetrametilbencidina (Roche) como sustrato. La reacción se detuvo con ácido 2n-sulfúrico y las placas se midieron a 450/490 nm.

#### 10 Lavado broncoalveolar (BAL) y diferenciación celular

Los líquidos del lavado se recolectaron 24 horas después de la última exposición al aerosol de OVA. La tráquea se canuló y el BAL se realizó mediante dos lavados con 0.8 ml de PBS frío en hielo. Se determinó el volumen recuperado de BAL y el número total de células. Cytospins se prepararon para cada muestra mediante la centrifugación de 50 µl de líquido de BAL/150 µl de PBS (100 g durante 5 minutos). Después de la fijación las citospinas se tiñeron con Diff Quick (Baxter Dade). Se realizaron recuentos diferenciales celulares de 100 células. Las células se clasificaron como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos o linfocitos mediante los criterios morfológicos estándar.

#### 20 Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la presencia de LGG en las heces de los ratones tratados. La presencia de LGG se evaluó en muestras fecales de ratones tratados con LGG frente a ratones que recibieron sólo PBS. Después del cultivo microbiano, LGG estuvo presente en muestras fecales de ratones tratados con LGG mientras que no pudo detectarse LGG en ratones tratados con PBS (Fig. 2A). Para confirmar además que la LGG detectada es de hecho idéntica a la LGG de la suplementación, se preparó ADN a partir de muestras fecales y se amplificó con los iniciadores específicos para PCR de LGG. Como se muestra en la Figura 1B, los productos de PCR específicos de LGG pudieron detectarse en las muestras de ratones tratados con LGG mientras que no fueron detectables los productos de PCR específicos de LGG en muestras de ratones tratados con PBS (Fig. 2B). Este resultado indica que el tratamiento prenatal y postnatal temprano de los ratones resultó en la colonización del intestino y la LGG aún es detectable por al menos tres semanas después de la última administración de la suplementación de LGG.

Para evaluar si el tratamiento materno con LGG resulta en la colonización de LGG a largo plazo (más de 3 semanas después de detener la suplementación), se preparó ADN a partir de muestras fecales de los ratones a la edad de 53 días. El análisis por PCR reveló que ni los ratones tratados con PBS ni los tratados con LGG se colonizaron con LGG (Fig. 2C). Este resultado indica que la LGG materna suministrada no resulta en la colonización a largo plazo de la descendencia durante el período postnatal

Para evaluar además si la suplementación prenatal y postnatal temprana de LGG tiene impacto en la distribución de la colonización bacteriana en intestino, se evaluaron diversas cepas bacterianas (LGG, Enterococcus, E. coli, Staphylococcus aureus, Bacteroides) en muestras fecales. Como se muestra en la Figura 3, hubo una tendencia a que la suplementación de LGG altera la colonización bacteriana de una manera beneficiosa. Se detectaron bacterias de las especies Enterococcus, E. coli, y Bacteroides en números superiores en las muestras fecales de los ratones complementados con LGG en comparación con los ratones control (Fig 3). Además hubo una tendencia a la reducción de la colonización de Staphylococcus aureus en el intestino en comparación con los ratones con PBS. Estos resultados indican que tratamiento con LGG mejora la colonización en el intestino sano normal y en paralelo, dificulta la proliferación de bacterias (patológicas) en los intestinos de ratones.

#### 50 Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG en la producción de anticuerpos específicos de alérgeno en suero en sujetos alérgicos. Se estudió además si la suplementación prenatal y postnatal temprana de LGG suprime el desarrollo de un fenotipo alérgico más tarde en la vida. Por lo tanto, la producción de anticuerpos específicos a alérgeno se evaluó en la descendencia de ratones después de la sensibilización intraperitoneal a OVA que sigue a la exposición al aerosol de alérgeno OVA. Como se muestra en las Figuras 4A y 4B, la suplementación materna de LGG dificulta el desarrollo de una respuesta de anticuerpos específicos a alérgenos como se indica por una reducción significativa de la producción de IgG1 anti-OVA en ratones con exposición prenatal y postnatal temprana a LGG en comparación con los controles con PBS (Fig. 4A, B). La subclase IgG1 de anticuerpos murinos es la molécula efectora en las manifestaciones alérgicas tales como las pruebas de punción cutánea positivas y desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias. Con respecto a esta función alérgica efectora, la subclase IgG1 de anticuerpos murinos es igual a la subclase IgE de anticuerpos humanos. Con respecto al nivel de producción de anticuerpos IgG2a anti-OVA, fueron detectables diferencias significativas (Fig. 4C). Estos resultados indican que la suplementación materna de LGG reduce la sensibilización alérgica a un alérgeno respiratorio más tarde en la vida.

#### 65 Ejemplo 4

Este ejemplo indica el efecto de LGG sobre el aumento de anticuerpos IgA en suero en sujetos. La leche materna contiene altos niveles de anticuerpos secretores de la subclase IgA. Además se conoce bien que esta subclase de anticuerpos se asocia con el desarrollo de la tolerancia inmunológica después de la exposición al alérgeno. Por lo tanto, el resultado de que hubo un aumento significativo de la producción de anticuerpos IgA en suero en la descendencia de madres complementadas con LGG en comparación con la descendencia de madres control (PBS) fue sorprendente (Fig. 5). Este resultado indica que la suplementación materna de LGG no sólo dificulta el desarrollo de una respuesta inmunológica alérgica en la descendencia, como se indica por una disminución significativa de la producción de anticuerpos IgG1, sino que además induce un patrón de producción de anticuerpos (IgA) que se asocia con el desarrollo de tolerancia inmunológica.

#### Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG en la producción de citocinas proinflamatorias de células esplénicas en sujetos. Para evaluar además si el efecto beneficioso de la suplementación materna de LGG en la producción de anticuerpos en la descendencia se asoció con una respuesta inmunológica relacionada con la tolerancia inmunológica, las células mononucleares del bazo de la descendencia sensibilizada y no sensibilizada a OVA se cultivaron en presencia de LGG o alérgeno (OVA). La producción de citocinas se evaluó después de 72 horas. La descendencia de las madres de ratones complementadas con LGG mostró una reducción significativa de la producción de IFN-gamma, MCP-1, IL-10 e IL-6 (Fig. 6 A-D). Estos resultados indican que la exposición materna a LGG resulta en una regulación significativamente negativa de citocinas proinflamatorias en estos ratones.

#### Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG en la supresión de la inflamación de las vías respiratorias en sujetos alérgicos. Para probar si el efecto de la exposición prenatal a LGG influye en el desarrollo de asma experimental, los ratones sensibilizados a OVA se desafiaron con alérgeno en aerosol cuatro veces. La inflamación de las vías respiratorias se investigó mediante el análisis de los líquidos del lavado broncoalveolar (BAL). Los líquidos de BAL a partir de ratones sensibilizados a OVA de madres con exposición materna a LGG contenían números significativamente menores de leucocitos cuando se compara con los ratones sensibilizados a OVA expuestos prenatalmente a PBS (Fig. 7). Además, la composición celular de los líquidos de BAL mostró una reducción significativa de granulocitos de eosinófilos, así como también macrófagos mientras que los linfocitos sólo mostraron una tendencia hacia números menores.

#### Ejemplo 7

Este ejemplo describe los materiales y métodos necesarios para demostrar el efecto de la administración prenatal y postnatal de LGG en el desarrollo de las alergias respiratorias y la inflamación en el pulmón y las vías respiratorias. Los ratones hembra BALB/c recibieron LGG i.g. antes del apareamiento para producir ratones BALB/c y durante el embarazo. La suplementación de LGG se continuó después del parto de la descendencia durante la lactancia materna hasta el día 21 después del parto. Los ratones control recibieron PBS en vez de LGG.

Los ratones hembra BALB/c recibieron 5 aplicaciones i.g. de  $10^8$  ufc de LGG liofilizada en un volumen de 200  $\mu$ l (reconstituida en PBS) en los días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Los controles sólo recibieron PBS. En los días 21 y 28 todos los animales recibieron inyecciones i.p. de sensibilización de 100  $\mu$ g de proteínas de la leche de vaca junto con 1.5 mg de Al(OH)<sub>3</sub> adyuvante. Para evaluar los niveles de anticuerpos en suero y la función efectora inmunológica (PCA) se recolectó sangre en los días 0 y 49.

Las ratas Wistar se afeitaron en la parte posterior y los flancos y se inyectaron intradérmicamente con 0.1 ml de los sueros de prueba en diluciones tomados a partir de los ratones en el día 49, seguido 24 horas más tarde con una inyección intravenosa de 1 ml de una mezcla 1:1 de una solución de proteínas de la leche de vaca (Mead Johnson Nutritional, Evansville, IN, Estados Unidos) y una solución de azul Evans (2 % en solución salina estéril). Después de 20 a 30 min., los animales se examinaron para la respuesta positiva. Se midió el diámetro de la extravasación de colorante en el sitio de la inyección de suero.

Los niveles de los títulos de los anticuerpos IgG1, IgG2 e IgE específicos de la leche de vaca se determinaron mediante la técnica de ELISA en el día 49. Las placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano para microtitulación (Nunc, Alemania) se revistieron con proteína de la leche de vaca (5  $\mu$ g/ml) diluida en amortiguador de carbonato de revestimiento 0.1 M, pH 9.6, seguido por 1 hora de bloqueo (37 °C) con PBS/1 % de BSA/0.02 de Tween 20. En cada placa una curva de referencia generada con una mezcla de suero positivo (control de 49 días) se determinó (dilución de partida 1:10 para IgE, 1:100 para IgG2a y 1:6400 para IgG1) un conjunto a 1000 Unidades Arbitrarias/ml (AU/ml) para niveles de Ab específicos a Ag específicos. Para la detección de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a, se añadieron anticuerpos conjugados a PO (1 hora a 37 °C). Posteriormente, se usó 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB; Sigma, Alemania, 100  $\mu$ l/pocillo; 6 mg/ml de DMSO) para la reacción de color, que se detuvo con 100  $\mu$ l/pocillo de solución de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y la absorbancia se midió a 450 nm. Los títulos de anticuerpos específicos de la leche de vaca se expresaron como unidades arbitrarias (AU) en comparación con el suero de referencia.

La sangre se recolectó antes y 1 hora después de un desafío oral con 100 mg de proteínas de leche de vaca/animal en

el día 56 y los niveles de MMCP-1 en suero se determinaron con un kit de ELISA (Moredun, Escocia). El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron mediante el uso del programa informático GraphPad Prism, Versión 3.02. Las diferencias entre las medias de los grupos se determinaron mediante el uso de una prueba de Mann Whitney-U. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

5

#### Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra la presencia de LGG en las heces de ratones tratados prenatal y postnatalmente con LGG. La presencia de LGG se evaluó en muestras fecales de ratones tratados con LGG frente a ratones que recibieron sólo PBS. Después del cultivo microbiano, LGG estuvo presente en las muestras fecales de los ratones tratados con LGG, mientras que no pudo detectarse LGG en los ratones tratados con PBS. Para confirmar además que la LGG detectada es de hecho idéntica a la LGG de la suplementación, se preparó ADN a partir de muestras fecales y se amplificó con los iniciadores específicos para PCR de LGG. Como se muestra en la figura 1B, los productos de PCR específicos de LGG pudieron detectarse en las muestras de ratones tratados con LGG mientras que no fueron detectables los productos de PCR específicos de LGG en muestras de ratones tratados con PBS. Este resultado indica que el tratamiento prenatal y postnatal temprano de los ratones resultó en la colonización del intestino y LGG aún es detectable por al menos tres semanas después de la última suplementación de LGG.

10

15

20

Para evaluar si el tratamiento materno con LGG resulta en la colonización de LGG de los recién nacidos, el ADN se preparó a partir de muestras fecales de los recién nacidos a la edad de 53 días. El análisis por PCR reveló que ni los ratones tratados con PBS ni los tratados con LGG se colonizaron con LGG. Este resultado indica que la LGG suministrada a las madres no se transmite a los recién nacidos durante el período prenatal o postnatal.

25

30

Para evaluar además si la suplementación prenatal y postnatal temprana de LGG tiene impacto en la distribución de la colonización bacteriana del intestino, se evaluaron diversas cepas bacterianas (LGG, Enterococcus, E. coli, Staphylococcus aureus, Bacteroides) en muestras fecales. Hubo una tendencia a que la suplementación de LGG altera la colonización bacteriana de una manera beneficiosa. Se detectaron bacterias de las especies Enterococcus, E. coli, y Bacteroides en números superiores en las muestras fecales de ratones complementados con LGG en comparación con los ratones control. Además, hubo una tendencia a la reducción de la colonización de Staphylococcus aureus en el intestino de los ratones tratados con LGG cuando se compara con los ratones tratados con PBS. Estos resultados indican que el tratamiento con LGG puede mejorar la colonización normal del intestino sano normal y también dificulta la proliferación de bacterias patológicas en el intestino de ratones.

35

#### Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra el efecto de la suplementación prenatal y postnatal temprana de LGG en la producción de anticuerpos específicos de alérgeno en suero en recién nacidos alérgicos frente al control. La producción de anticuerpos específicos de alérgeno se evaluó en recién nacidos después de la sensibilización i.p. a OVA que sigue a la exposición al aerosol de alérgeno OVA. La suplementación materna de LGG dificulta el desarrollo de una respuesta de anticuerpos específicos a alérgeno como se indica por una reducción significativa de la producción de IgG1 anti-OVA en ratones tratados con LGG suplementada prenatal y postnatal temprano, en comparación con los controles de PBS. La subclase IgG1 de anticuerpos murinos es el equivalente humano del anticuerpo IgE. Esta es la molécula efectora en las manifestaciones alérgicas tales como las pruebas de punción cutánea positivas y el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias. El nivel de producción de anticuerpos IgG2a anti-OVA fue significativamente diferente entre los ratones tratados con LGG y los ratones tratados con PBS. Estos resultados indican que la suplementación materna de LGG reduce la sensibilización alérgica a un alérgeno más tarde en la vida.

40

45

#### Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra el efecto de la suplementación prenatal y postnatal temprana de LGG en la producción de anticuerpos IgA en suero en recién nacidos alérgicos frente al control. La leche materna contiene altos niveles de anticuerpos secretores de la subclase IgA. Además se conoce bien que esta subclase de anticuerpos se asocia con el desarrollo de la tolerancia inmunológica después de la exposición al alérgeno. Por lo tanto, el resultado de que hubo un aumento significativo de la producción de anticuerpos IgA en suero en recién nacidos de madres complementadas con LGG en comparación con los recién nacidos de madres control (PBS) fue sorprendente. Este resultado indica claramente que la suplementación materna de LGG no sólo dificulta el desarrollo de una respuesta inmunológica alérgica en recién nacidos como se indica por una significativa disminución de la producción de anticuerpos IgG1, sino que también induce un patrón de producción de anticuerpos (IgA) que se asocia con el desarrollo de tolerancia inmunológica.

60

#### Ejemplo 11

Este ejemplo ilustra el efecto de la suplementación prenatal y postnatal temprana de LGG en la producción de citocinas proinflamatorias en recién nacidos alérgicos frente al control. Las células mononucleares de bazo de los recién nacidos sensibilizados y no sensibilizados a OVA se cultivaron en presencia de LGG o alérgeno (OVA). La producción de citocinas se evaluó después de 72 horas. Los recién nacidos de madres complementadas con LGG mostraron una

65

reducción significativa de la producción de IFN-gamma, MCP-1, IL-10 e IL-6. Estos resultados indican que la exposición materna a LGG resulta en una regulación significativamente negativa de citocinas proinflamatorias en estos recién nacidos.

5 Ejemplo 12

Este ejemplo ilustra el efecto de la suplementación prenatal y postnatal temprana de LGG en la supresión de la inflamación de las vías respiratorias en recién nacidos alérgicos frente al control. Los ratones sensibilizados a OVA se desafiaron con alérgeno en aerosol cuatro veces. La inflamación de las vías respiratorias se investigó mediante el análisis de los líquidos del lavado broncoalveolar (BAL). Los líquidos de BAL de ratones sensibilizados a OVA de madres con exposición materna a LGG contenían un número significativamente menor de leucocitos cuando se compara con ratones sensibilizados a OVA que se expusieron prenatalmente a PBS ( $p < 0.05$ ). Además, la composición celular de líquidos de BAL mostró una reducción significativa de granulocitos de eosinófilos, así como también macrófagos ( $p < 0.05$ ) mientras que los linfocitos sólo mostraron una tendencia hacia números menores.

15 Ejemplo 13

Este ejemplo ilustra el efecto de la suplementación postnatal de LGG en el desarrollo de un fenotipo alérgico más tarde en la vida. Para evaluar el impacto de la exposición postnatal a LGG en el desarrollo de un fenotipo alérgico más tarde en la vida, los ratones hembra BALB/c recibieron LGG o solución salina PBS durante dos semanas (día 14). En los días 20 21 y 28, los ratones recibieron dos inyecciones de sensibilización de proteínas de la leche de vaca. En el día 49 y 56, se evaluaron la producción de anticuerpos específicos de la leche de vaca (Fig. 8) y la función efectora inmunológica, tal como la prueba de anafilaxis cutánea pasiva (Fig. 9A) y la liberación de proteasa-1 en mastocitos en suero después del desafío oral (Fig. 9B).

25 Como se muestra en la Figura 8, la suplementación postnatal de LGG dificulta el desarrollo de una respuesta de anticuerpos específicos de alérgenos como se indica por una reducción significativa de la producción de anticuerpos IgE específicos de la leche de vaca. La reducción de la producción de anticuerpos IgE específicos de alérgeno se asoció con ronchas y reacciones eritematosas significativamente menores después del desafío con alérgeno (Fig. 9A) La reducción de la producción de anticuerpos IgE específicos de alérgeno también se asoció con una reducción significativa de la liberación de la proteasa-1 en mastocitos después del desafío con alérgeno (Fig. 9B) Estos resultados indican que la suplementación de LGG reduce el desarrollo de una respuesta inmunológica específica de alérgeno y además reduce los síntomas de alergia después de la exposición al alérgeno. Por lo tanto, la exposición a LGG antes de la sensibilización alérgica reduce el desarrollo de un fenotipo alérgico más tarde en la vida.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición nutricional que comprende la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 para el uso en la prevención del desarrollo de alergias respiratorias y la reducción de la producción de anticuerpos IgE en suero en un sujeto, mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 antes de sensibilización alérgica del sujeto.
- 10 2. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las alergias respiratorias se seleccionan del grupo que consiste en rinitis alérgica, asma y sinusitis.
- 15 3. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la administración de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 al sujeto antes de la sensibilización alérgica del sujeto es postnatal y comprende la ingestión de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 por la madre del sujeto y la alimentación del sujeto por la madre.
- 20 4. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la ingestión de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 por la madre del sujeto se inicia antes del nacimiento del sujeto.
- 25 5. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la administración de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 al sujeto antes de la sensibilización alérgica del sujeto es postnatal y comprende la incorporación de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 en una fórmula infantil para el consumo de la fórmula por el sujeto.
- 30 6. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la administración de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 es postnatal y continúa por al menos 3 meses.
- 35 7. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la administración de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 es postnatal y continúa por al menos 6 meses.
- 40 8. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la administración de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 es postnatal y continúa por al menos 1 año.
9. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cantidad eficaz de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 es de entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^{10}$  ufc/L/kg/día.
10. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cantidad eficaz de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 es de entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^9$  ufc/L/kg/día.
11. La composición nutricional para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cantidad eficaz de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 es de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/L/kg/día.

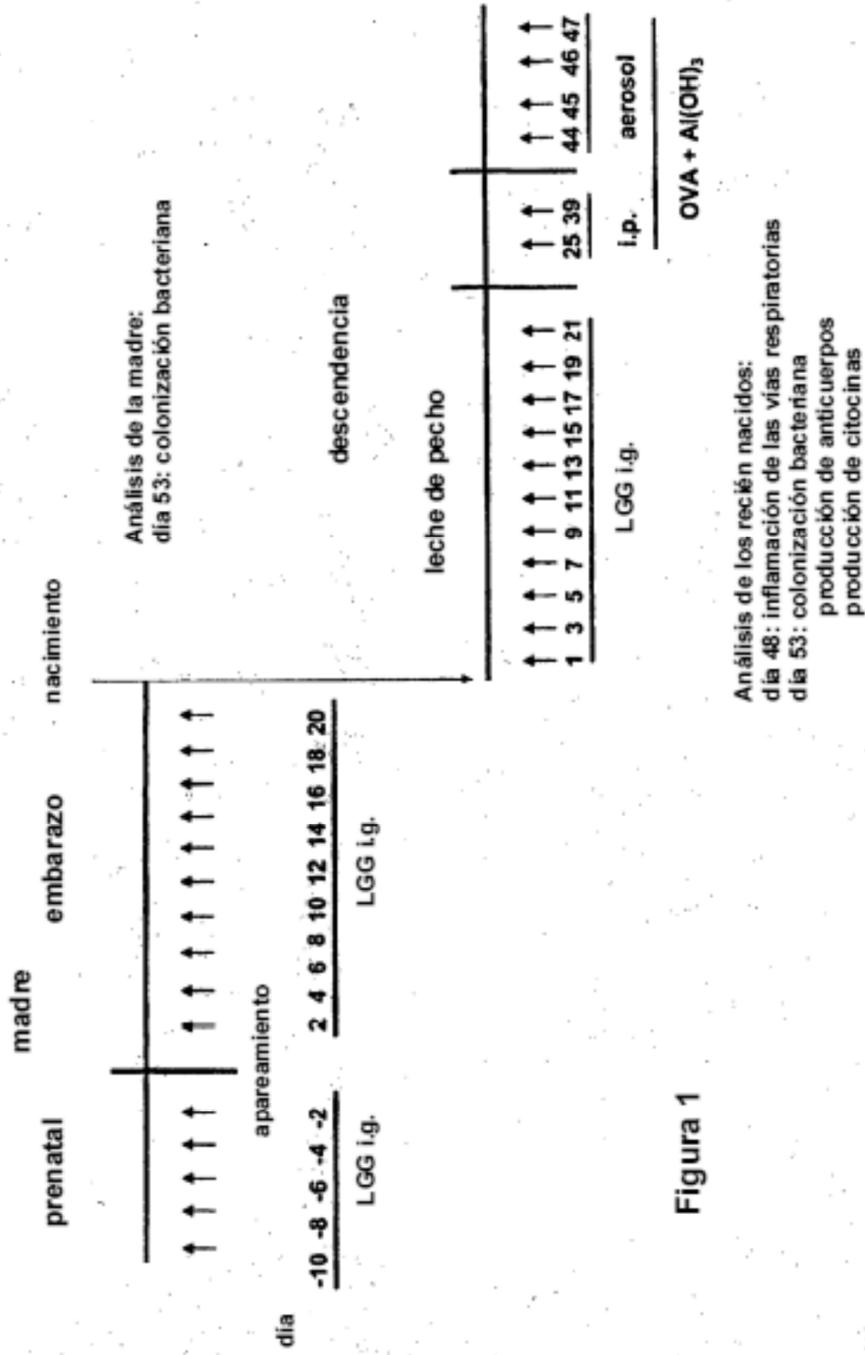


Figura 1

Figura 2

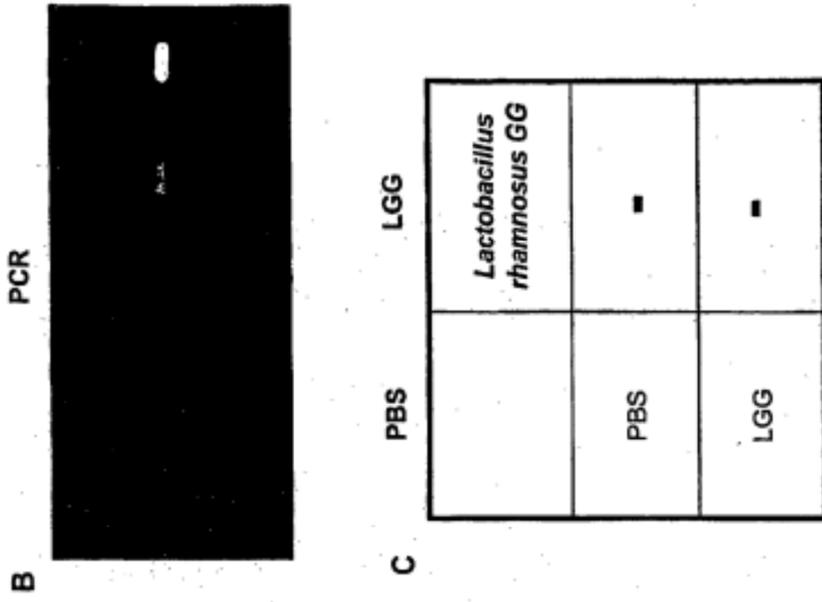


Figura 3

	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacteroides</i>
<b>PBS</b>	-	+	+	+ <sup>-</sup>	++
<b>LGG</b>	+++	++	++	-	+++

Info: Detectamos LGG (cultivos bacterianos, no PCR) en heces de la madre de ratones dos días después de la alimentación con LGG

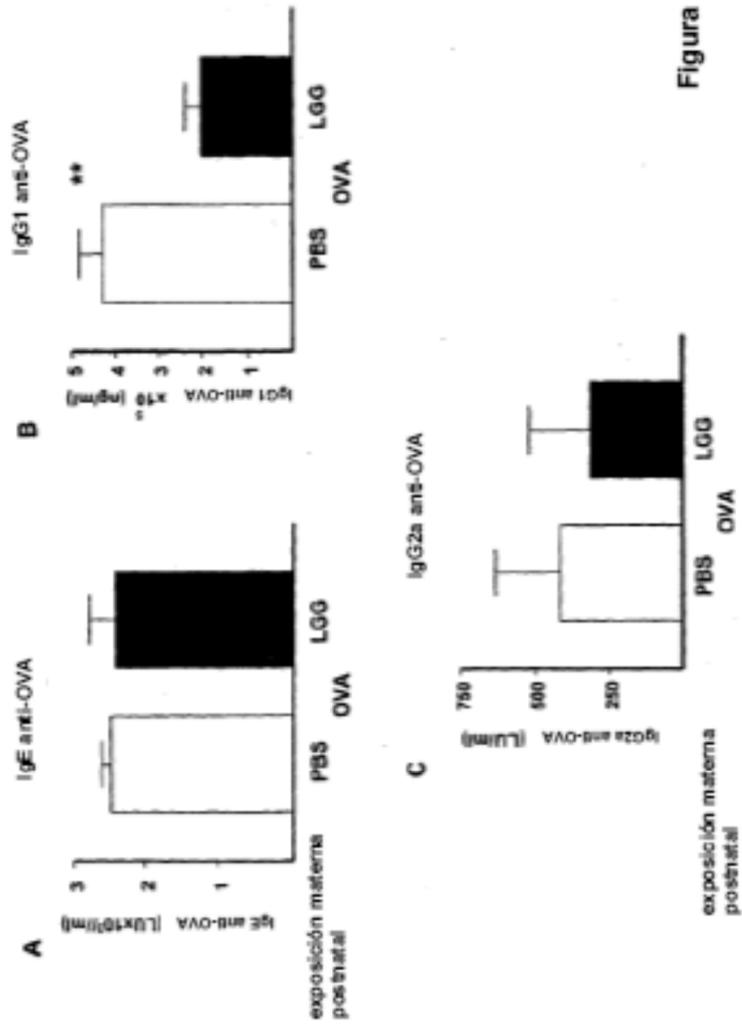
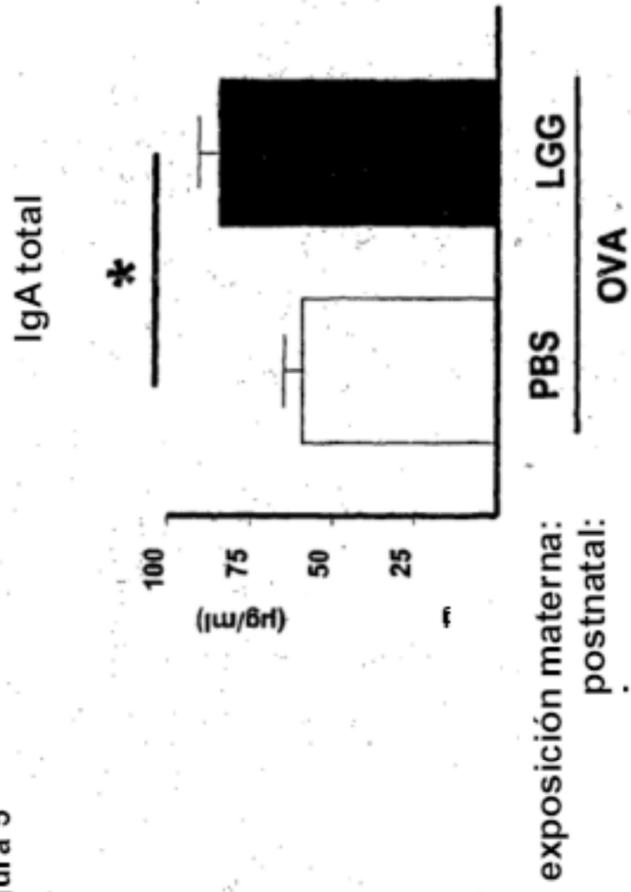
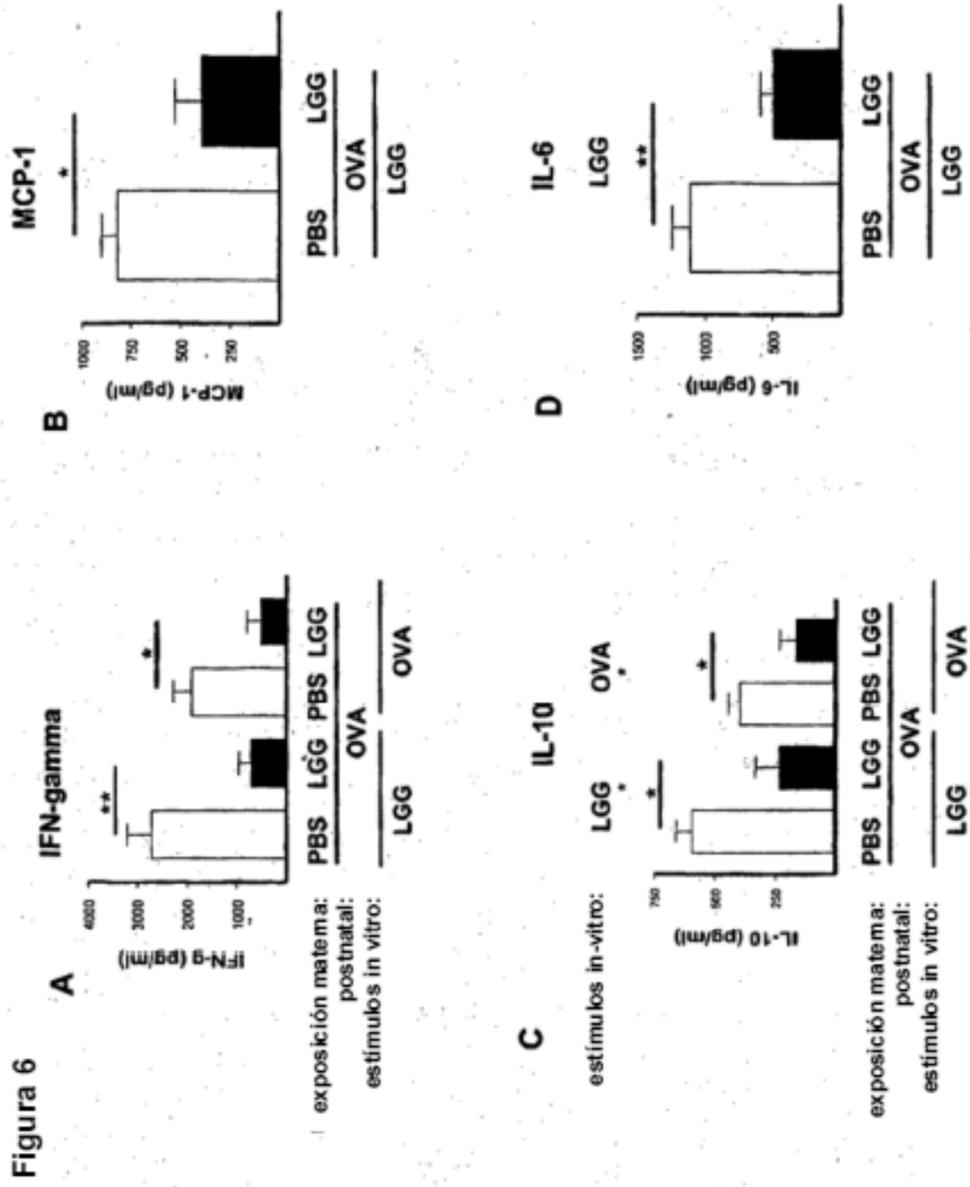


Figura 4

Figura 5





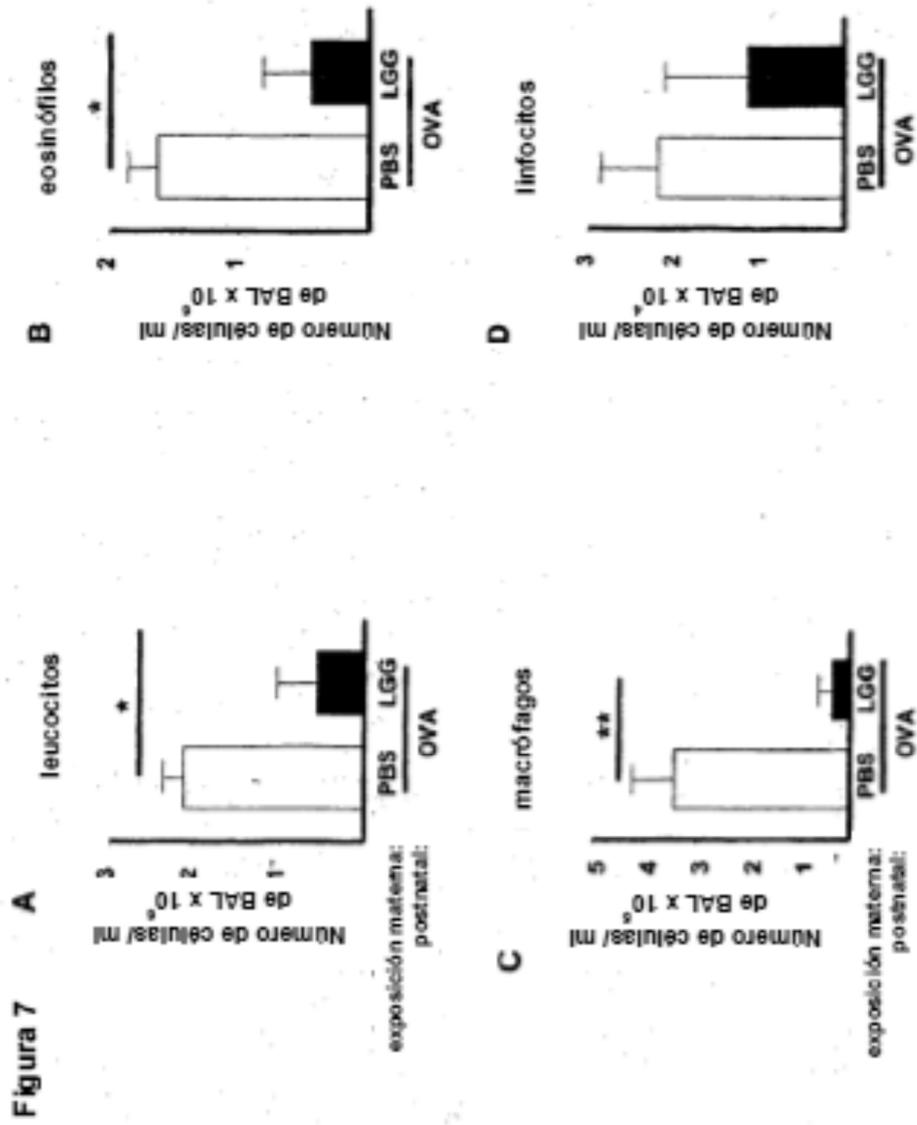


Figura 8

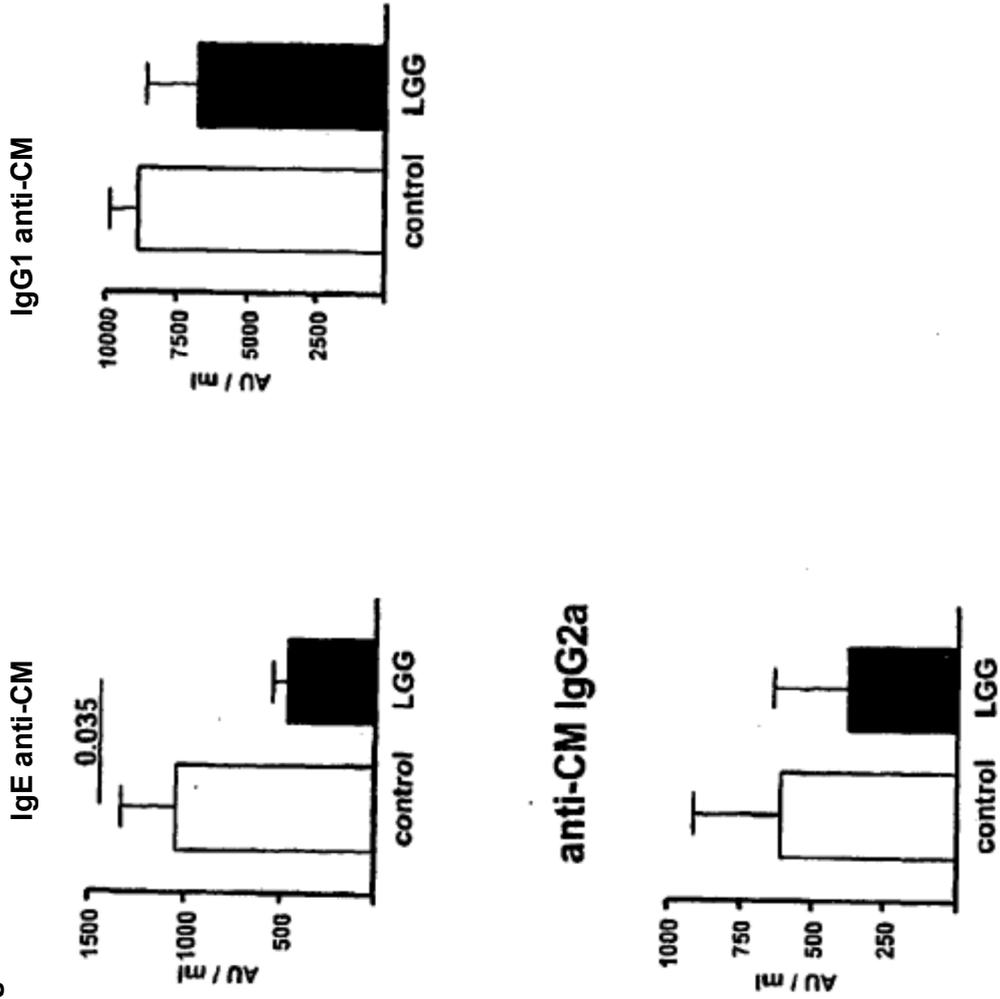


Figura 9

