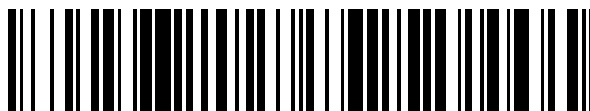


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 364**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 13189401 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2700412**

54 Título: **Probióticos, IgA secretor e inflamación**

30 Prioridad:

**24.06.2008 EP 08158827**

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

**08.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BENYACOUB, JALIL;  
CORTHEsy, BLAISE;  
BLUM-SPERISEN, STÉPHANIE y  
FAVRE, LAURENT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 641 364 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Probióticos, IgA secretor e inflamación

5 La presente invención se refiere de manera general al sector de la nutrición, salud y bienestar, y a los probióticos y las maneras de aumentar su eficacia. La presente invención se refiere a una composición que comprende SIgA y al menos un microorganismo probiótico, en la que la composición es una composición alimenticia destinada al consumo por los seres humanos, un producto alimenticio para animales, o una composición farmacéutica, en la que el SIgA y al menos un probiótico están presentes en forma de un complejo, y en la que dicho probiótico se  
10 selecciona entre el grupo que consiste en *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

La inflamación es la respuesta biológica compleja de tejidos a estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas o irritantes. En general, es un intento de protección por el organismo para eliminar los estímulos dañinos, así como para iniciar el proceso de curación para los tejidos. Sin embargo, una inflamación regulada de forma no apropiada puede conducir a varias enfermedades, con independencia de la edad del paciente.  
15

El envejecimiento se asocia frecuentemente a una desregulación del sistema inmunitario, tal como una disminución observada de la respuesta inmunitaria mediada por células simultáneamente con una disfunción humoral inmunitaria incrementada (por ejemplo, menor respuesta a las vacunas). El envejecimiento se asocia además con frecuencia a un grado de inflamación de baja intensidad. Como consecuencia, en particular muchas personas mayores tienen un mayor riesgo de enfermedades infecciosas y no infecciosas que contribuyen a la morbilidad y a la mortalidad.  
20

La inflamación no deseada puede tratarse mediante medicación apropiada. Sin embargo, la medicación puede tener como resultado siempre efectos secundarios no deseados y con frecuencia requiere la supervisión de personal médico. Como consecuencia, existe la necesidad en este sector de composiciones que puedan administrarse preferentemente a diario, sin efectos secundarios no deseados y sin la necesidad de consultar a un médico y que puedan usarse para el tratamiento o la prevención de la inflamación.  
25

Una forma de conseguir este objetivo es administrar una composición alimenticia que comprenda probióticos.  
30

Los microorganismos probióticos se sabe que tienen un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del hospedador. En las últimas décadas, el uso de bacterias probióticas ha recibido una considerable atención como forma segura y accesible de tratamiento, por ejemplo, para enfermedades gastrointestinales (Isolauri E, et al., *Dig Dis Sci* 1994,39:2595-2600). Las bacterias probióticas típicas que se han empleado a este respecto pertenecen a los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*.  
35

La eficacia de los probióticos depende, en parte, de su capacidad de resistir las condiciones existentes en el tubo digestivo y en adherirse al epitelio intestinal. Además, un aspecto crítico que condiciona sus beneficios potenciales con respecto al hospedador es la interacción ("cross-talk") del probiótico con el entorno del hospedador y su impacto en la barrera del epitelio y su función.  
40

Si bien algunos probióticos ya consiguen resultados muy respetables en términos de colonización del tubo gastrointestinal y de interacción con el hospedador, sería deseable tener disponible una herramienta para mejorar adicionalmente la eficacia con la que los microorganismos probióticos colonizan el intestino e interaccionan con el hospedador.  
45

Como consecuencia, el objetivo de la presente invención era proporcionar a la técnica una composición que tuviera las mismas ventajas que la administración de probióticos a una persona que los necesite pero que fuera incluso más eficaz en el tratamiento o la prevención de la inflamación que la administración de probióticos solos.  
50

Los presentes inventores abordaron esta necesidad y descubrieron que podían conseguir este objetivo mediante una composición de acuerdo con la reivindicación 1.

La presente invención se refiere por tanto a una composición que comprende SIgA y al menos un microorganismo probiótico, en la que la composición es una composición alimenticia destinada al consumo por los seres humanos, un producto alimenticio para animales o una composición farmacéutica, en la que el SIgA y al menos un probiótico están presentes en forma de un complejo, y en la que dicho probiótico se selecciona entre el grupo que consiste en *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.  
55

Sin desear quedar limitados por ninguna teoría, los inventores creen que SIgA y los probióticos forman complejos que pueden potenciar la interacción de probióticos con el hospedador y mejorar su estado de salud.  
60

El mecanismo de interacción sugerido de la combinación inmunitaria con la mucosa intestinal del hospedador se indica en la figura 1.  
65

La primera interacción de probióticos con el hospedador se produce a nivel de la mucosa intestinal. Entre los criterios principales para la selección de un microorganismo probiótico se encuentra su capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.

5 Esta adherencia parece ser necesaria para bloquear la entrada de patógenos y contribuir a modular, por ejemplo, las funciones protectoras inmunitarias.

Una de las propiedades más características del sistema inmunitario de la mucosa en la mayor parte de mamíferos es la presencia predominante de anticuerpos secretores, en particular, IgA (SIgA) secretor, una clase de anticuerpos exclusiva de las mucosas.

La biosíntesis del IgA polimérico tiene lugar en la lámina propia de la mucosa, y su transporte a través del epitelio que recubre las superficies de la mucosa está asegurada por el receptor de Ig polimérico (pIgR) expresado por células epiteliales foliculares y columnares.

15 En las secreciones, una parte significativa del pIgR designada componente secretor (SC) permanece asociada a IgA polimérico, liberando SIgA.

La liberación de SIgA al lumen depende de la producción de SC, cuya expresión se regula positivamente después del nacimiento. El pIgR parece ser crítico para la estabilidad y el anclaje del anticuerpo en la mucosa (Phalipon et al. (2002) *Secretory component: A new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. Immunity* 17:107-115).

Los inventores creen en la actualidad que es esta asociación de SIgA con probióticos la que potencia la interacción de los probióticos con el hospedador, de manera que se mejoran los beneficios de la salud para el hospedador.

25 Los presentes inventores han identificado que una combinación del anticuerpo SIgA con probióticos es capaz de mejorar la interacción de las bacterias con una estirpe celular humana, sirviendo como un mimético del epitelio gastrointestinal.

30 Los presentes inventores han utilizado *in vitro*, monocapas de células epiteliales Caco-2 para examinar cómo SIgA favorece la interacción entre las bacterias no patógenas y la superficie del epitelio. Dos cepas probióticas representativas de los dos géneros principales *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* se evaluaron como prueba de principio, es decir, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818).

35 Se descubrió que SIgA y/o SC, cuando se asocian a probióticos, promueven la interacción de probióticos con el hospedador y modulan procesos corriente abajo implicados en mecanismos de defensa.

Esto contribuye a potenciar los beneficios sanitarios de los probióticos. A través de su combinación con probióticos, SIgA y/o SC podrían ayudar de manera óptima a desencadenar reacciones eficientes de protección y defensa del hospedador, incluyendo respuestas inmunes contra diversos patógenos. Dado su efecto homeostático (Corthesy B. (2007), *J. Immunol.*;178: 27-32), SIgA combinado con probióticos, ayudará a desencadenar un efecto de estímulo inmunitario, impidiendo simultáneamente cualquier proceso inflamatorio perjudicial.

45 Como consecuencia, puede usarse una composición que comprende SIgA y, al menos, un probiótico para la preparación de un producto para el tratamiento o la prevención de la inflamación.

"Probiótico" significa preparado de células microbianas o de componentes de células microbianas con efecto beneficioso para la salud o bienestar del hospedador. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. et al. "*Probiotics: how should they be defined*" *Trends Food Sci. Technol.* 1999:10 107-10).

50 Todos los microorganismos microbióticos se seleccionan entre el grupo que consiste en *Bifidobacterias* y *Lactobacillus* pueden usarse de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, se seleccionan entre el grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus reuteri* o mezclas de los mismos, preferentemente entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* (NCC533; CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (NCC490; CNCM I-2170), *Bifidobacterium longum* (NCC2705; CNCM I-2618), *Bifidobacterium lactis* (2818; CNCM I-3446), *Lactobacillus paracasei* (NCC2461; CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007; CGMCC 1.3724) y mezclas de los mismos.

60 La composición de la presente invención puede contener también prebióticos. La adición de prebióticos es beneficiosa puesto que, combinada con probióticos, facilita efectos sinérgicos en términos de beneficios en la salud. Una composición que comprende una combinación de prebióticos y probióticos se conoce habitualmente como una composición simbiótica.

65 "Prebiótico" significa sustancias alimenticias que promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas tales como bifidobacterias o lactobacilos y/o probióticos en el intestino. No se descomponen en el estómago ni se absorben en

el tubo GI de la persona que los ingiere, sino que son fermentados por la microflora gastrointestinal y/o por los probióticos.

5 Los prebióticos que pueden usarse de acuerdo con la presente invención no están especialmente limitados e incluyen todas las sustancias alimenticias que favorecen el crecimiento de probióticos en el intestino.

10 Preferentemente, pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en oligosacáridos, que contienen opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; fibras de dieta, en particular fibras solubles, fibras de soja; inulina; o mezclas de los mismos. Son prebióticos preferidos los fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos de soja, glicosil sacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), oligosacáridos de palatinosa (PAO), maltooligosacáridos, pectinas y/o hidrolizados de los mismos.

15 Las afecciones inflamatorias típicas que pueden tratarse o prevenirse, incluyen pero no se limitan a inflamaciones agudas tales como sepsis, infecciones, quemaduras, e inflamaciones crónicas tales como enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enterocolitis necrotizante, inflamación cutánea, tal como inflamación de la piel inducida por UV o de forma química, eczema, piel reactiva, soriasis, vitiligo, acné, inflamación del hígado, cirrosis alcohólica, alergia, atopía, inflamación de huesos, artritis reumatoide, lupus sistémico, síndrome de Gougerot-Sjögren, síndrome de Reiter, poliomielititis, dermatomiositis, tiroiditis, diabetes de tipo I, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad celíaca, enfermedad de Biermer, esclerosis múltiple, miastenia, encefalomielititis, inflamación de los ojos, inflamación asociada a obesidad, inflamación de baja intensidad relacionada con la edad, síndrome de Blau, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, síndrome metabólico, gingivitis, parodontitis y combinaciones de las mismas.

20 La composición de la presente invención puede usarse también para controlar y/o aliviar reacciones inflamatorias del cuerpo.

25 La composición de la presente invención, puede usarse adicionalmente para generar, mejorar o reforzar la homeostasis y la tolerancia oral.

30 La composición de la presente invención es un producto alimenticio destinado al consumo por los seres humanos, un producto alimenticio para animales, o una composición farmacéutica. Por ejemplo, la composición puede ser una composición nutricional, un nutraceutico, una bebida, un aditivo alimenticio o un medicamento.

35 Un aditivo alimenticio o un medicamento pueden adoptar la forma de comprimidos, cápsulas, pastillas o un líquido, por ejemplo. Se proporcionan aditivos alimenticios o medicamentos preferentemente como formulaciones de liberación sostenida, permitiendo un suministro constante de SlGA y de probióticos durante un tiempo prolongado.

40 La composición se selecciona, preferentemente, entre el grupo que consiste en productos a base de leche en polvo; bebidas instantáneas; formulaciones listas para beber, polvos nutricionales, líquidos nutricionales, productos a base de leche, en particular yogures o helados; productos de cereales, bebidas, agua, café, capuchino, bebidas de malta, bebidas con sabor a chocolate, productos culinarios, sopas, comprimidos y/o jarabes.

45 La leche puede ser cualquier leche obtenible de animales o plantas y es preferentemente leche de vaca, leche humana, leche de oveja, leche de cabra, leche de caballo, leche de camello, leche de arroz o leche de soja.

En lugar de leche, también pueden usarse fracciones de proteínas derivadas de la leche o calostro.

50 La composición puede contener además hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de película, agentes/materiales de encapsulado, materiales de pared/cubierta, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, cargas, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, adyuvantes de procesamiento (disolventes), agentes fluidificantes, agentes de enmascarado del sabor, agentes de carga, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y antimicrobianos. También pueden contener aditivos farmacéuticos convencionales y adyuvantes, excipientes y diluyentes, incluyendo, pero no limitados a, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, sulfonato de lignina, talco, azúcares, almidón, goma arábica, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes saborizantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, agentes de carga y similares. Adicionalmente, pueden contener un material de vehículo orgánico o inorgánico adecuado para la administración oral o entérica, así como vitaminas, elementos traza de minerales y otros micronutrientes de acuerdo con las recomendaciones de organismos estatales tales como USRDA.

60 La composición de la presente invención puede comprender una fuente de proteínas, una fuente de carbohidratos y/o una fuente de lípidos.

65 Se puede utilizar cualquier proteína alimentaria adecuada, por ejemplo, proteínas animales (tales como proteínas de la leche, proteínas de la carne, y proteína de huevos); proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de

trigo, proteína de arroz y proteína de guisantes); mezclas de aminoácidos libres o combinaciones de los mismos. Se prefieren especialmente las proteínas de la leche tales como caseína y suero, y proteínas de la soja.

5 Si la composición comprende una fuente de grasas, la fuente de grasas proporciona más preferentemente del 5 % al 40 % de la energía de la fórmula; por ejemplo, del 20 % al 30 % de la energía. Se puede añadir DHA. Se puede obtener un perfil adecuado de grasas usando una mezcla de aceite de colza, aceite de maíz y aceite de girasol alto oleico.

10 Una fuente de carbohidratos puede proporcionar más preferentemente, entre el 40 % y el 80 % de la energía de la composición. Se puede utilizar cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, malto-dextrinas y mezclas de los mismos.

15 La composición de la presente invención que se puede administrar a humanos o a animales, en particular animales de compañía, domésticos o ganado. Tiene efectos beneficiosos para cualquier grupo de edad. Preferentemente, el producto está destinado a lactantes, jóvenes, adultos, o personas mayores. Sin embargo, puede administrarse a madres durante el embarazo y lactancia para el tratamiento del niño.

20 Se ha descubierto que la combinación de probióticos y SIgA es particularmente eficaz si el SIgA y probióticos se combinan en complejos antes de la administración. Esto tiene la ventaja de que los complejos beneficiosos no necesitan formarse después del consumo del producto, sino que ya se encuentran presentes en el producto alimenticio.

25 La composición puede comprender también, al menos, otro tipo de otra bacteria de calidad alimenticia, preferente seleccionada entre el grupo que consiste en bacterias ácido lácticas, bifidobacterias, enterococos o mezclas de las mismas. Estas otras bacterias de calidad alimenticia pueden contribuir a obtener una microflora intestinal sana y, por tanto, contribuirán a conseguir el objetivo de la presente invención de manera todavía más eficaz.

30 El SIgA y el microorganismo probiótico pueden encontrarse presentes preferentemente en una relación estequiométrica de, al menos 10:1, preferentemente, al menos 100:1, más preferentemente, al menos de 2000:1 a 100000:1. Evidentemente, cuantas más moléculas de SIgA estén fijadas a la superficie del microorganismo probiótico, más eficaz será esta combinación. El límite superior de saturación de SIgA está determinado por la superficie de los microorganismos probióticos y por el número de sitios de unión disponibles para el SIgA.

35 Normalmente, los probióticos pueden ser eficaces en un amplio intervalo de cantidad. En general, es preferible que el producto comprenda entre  $10^2$  y  $10^{10}$  células de probióticos por dosis diaria.

La cantidad de SIgA requerida para conseguir un efecto, tampoco está limitada. Es preferible, en general, que el producto comprenda entre 0,0001 mg de SIgA y 100 mg de SIgA por dosis diaria.

40 Los expertos en la materia comprenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención que descritas en el presente documento, sin salir del ámbito de la invención como se desvela. En particular, las características descritas para los usos de la presente invención se pueden aplicar a la composición alimenticia de la presente invención, y viceversa.

45 Otras ventajas y características de la presente invención son evidentes a partir de los siguientes ejemplos y figuras.

50 La figura 1 muestra esquemáticamente cómo se cree que el SIgA mejora los efectos de bacterias comensales, cuando se asocia a ellas al incrementar la interacción con la mucosa intestinal del hospedador. Se representan vías posibles y documentadas de interacción de SIgA asociado a bacterias comensales con la mucosa intestinal del hospedador.

55 La figura 2 muestra el resultado de experimentos de comprobación de las propiedades de unión de dos cepas probióticas, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818), representativas de los dos géneros principales de Lactobacilos y Bifidobacterias a células epiteliales. Los datos se expresan como UFC medias por 100 células Caco-2  $\pm$  ETM.

60 La figura 3 muestra el resultado de experimentos de comprobación de las propiedades de unión de las dos cepas probióticas, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818), representativas de los dos géneros principales de Lactobacilos y Bifidobacterias a células epiteliales y la influencia de IgA secretor (SIgA) o componente secretor (SC). Los datos se expresan como UFC medias por 100 células Caco-2  $\pm$  ETM.

65 La figura 4 muestra los resultados de experimentos de comprobación del efecto de dos cepas probióticas, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (LPR) y *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (BL818), representativas de los dos géneros principales de Lactobacilos y Bifidobacterias, solos o en combinación con SIgA o SC, sobre la

resistencia eléctrica transepitelial (TER) que mide la permeabilidad epitelial. Los datos se expresan como ohmios medios por  $\text{cm}^2 \pm \text{ETM}$ .

5 La figura 5 muestra el resultado de experimentos de comprobación del efecto de LPR, combinado o no con SIgA o SC, sobre activación NF- $\kappa$ B en una monocapa de células Caco-2. La disminución en la actividad de unión de NF- $\kappa$ B es indicativa de ruta o rutas inflamatorias atenuadas dentro de la célula Caco-2.

10 La figura 6 muestra el resultado de experimentos de comprobación del efecto de LPR, combinado o no, con SIgA o SC, sobre invasión de *S. flexneri* de células Caco-2. Se utilizaron dos células SIgA monoclonales: una SIgA no específica (SIgA no específica) que reconoce un epítipo de Salmonella, y una anti-*S. flexneri* específica de SIgA (SIgAC5). Los datos se expresan como UFC medias por filtro Transwell  $\pm \text{ETM}$ .

15 La figura 7 muestra el resultado de experimentos de comprobación del efecto de los probióticos sobre la expresión del receptor Ig polímero (pIgR) en una monocapa de Caco-2. (A) Se comprobaron diferentes tratamientos después de 16 horas, incluyendo una combinación de probióticos con SIgA no específico y combinación de *S. flexneri* con SIgA específico anti-*S. flexneri* (transferencia Western). (B) El análisis semicuantitativo de niveles de expresión de pIgR normalizados a  $\beta$ -actina por análisis densitométrico de las bandas identificadas en los geles de A. (C) Cinética de la expresión de pIgR a lo largo de 24 horas de incubación de células Caco-2 con diferentes preparaciones (ELISA).

20

Ejemplo 1:

• UNIÓN A CÉLULAS EPITELIALES

25 Se sembraron aproximadamente  $10^6$  células Caco-2 por  $1 \text{ cm}^2$  de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 16 horas a  $37^\circ\text{C}$  con diferentes dosis de bacterias, indicadas en las leyendas de la figura, en ausencia de antibióticos o FCS. Se utilizaron cultivos recientes después de una noche de bacterias LPR, BL818 y *E. coli* TG-1. Las células después se lavaron antes de la enumeración. Las bacterias unidas se contaron en placas sobre placas de MRS o LB. Para cada experimento se realizaron ensayos por triplicado. Los datos se expresaron como medias de bacterias unidas por 100 células Caco-2  $\pm \text{ETM}$ . Se realizaron ensayos por triplicado para cada experimento. En un experimento posterior, se incubaron células con  $2 \times 10^7$  de bacterias durante 16 horas a  $37^\circ\text{C}$ , en presencia de dosis crecientes de SIgA o SC como se indica en la leyenda de la figura 3. Las células después se lavaron antes de la enumeración. Las bacterias unidas se contaron por cultivo en placa, sobre placas MRS o LB. Para cada experimento, se realizaron ensayos por triplicado. Los datos se expresaron como medias de las bacterias unidas por 100 células Caco-2  $\pm \text{ETM}$ . Se realizaron ensayos por triplicado para cada experimento.

30

35

Se observa una unión preferente a células Caco-2 polarizadas de LPR y BL818 en comparación con *E. coli* TG-1 (figura 2). Existe una capacidad de unión dependiente de la dosis de los probióticos a las células epiteliales intestinales. Se puede observar que las propiedades de unión podrían ser diferenciadas entre las dos cepas.

40

Para experimentos posteriores, se utilizaron  $2 \times 10^7$  UFC de probióticos, ya que esta cantidad no condujo a ningún cambio de pH en el medio por una parte, y mostró una proporción de unión eficiente por otra parte.

45 El incremento de la dosis de SIgA monoclonal potenció la capacidad de LPR y de BL818 de unirse a monocapas de células Caco-2 polarizadas. El componente secretor, en sí, no presentó dichas propiedades (figura 3). La dosis de  $1 \mu\text{g}$  de SIgA que confiere una mejora significativa en la capacidad de unión del probiótico, se seleccionó para experimentos posteriores. Esta dosis permite un complejo final constituido de 50.000 a 100.000 unidades de SIgA para 1 bacteria.

50

Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3.

Ejemplo 2:

• FUNCIÓN BARRERA EN MONOCAPA DE CÉLULAS CACO-2 POLARIZADAS

55 Se sembraron aproximadamente  $10^6$  células Caco-2 por  $1 \text{ cm}^2$  de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  con  $2 \times 10^7$  UFC de bacterias en ausencia de antibiótico o FCS. Las bacterias fueron comprobadas solas o en combinación con SIgA o SC a las concentraciones indicadas en la leyenda de la figura 4. Se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TER) a 3, 6, 9, 15 y 24 horas. Los controles incluyen incubación con SIgA y SC solo. Se realizaron ensayos por triplicado para cada experimento.

60

Un incremento del 20-25 % en resistencia eléctrica transepitelial (TER) resultó de la incubación de una monocapa de células Caco-2 polarizada con LPR o BL818 solo, sugiriendo que los probióticos potenciaban la función de barrera epitelial. Esto siguió siendo cierto cuando las bacterias se combinaron con SIgA o SC (figura 4). SIgA o SC, por sí mismas, no condujeron a ningún cambio de la TER.

65

Los resultados se muestran en la figura 4.

Ejemplo 3:

5 • ACTIVACIÓN DE NF- $\kappa$ B EN MONOCAPA DE CÉLULAS CACO-2 POLARIZADAS

10 Se sembraron aproximadamente  $10^6$  células Caco-2 por  $1\text{ cm}^2$  de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 16 horas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  con  $2 \times 10^7$  UFC de LPR in en ausencia de antibiótico o FCS. Las bacterias se sometieron a ensayo solas o en combinación con SIgA o SC a las concentraciones indicadas en la leyenda de la figura 5. Se usaron *S. flexneri*, *S. typhi* y *H. pylori* ( $2 \times 10^7$  UFC) como controles patogénicos. Se prepararon extractos nucleares y citoplásmicos y se realizaron por ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) y transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -específico. Se realizaron ensayos por triplicado para cada experimento.

15 La exposición a bacterias patógenas condujo a una activación mucho más pronunciada de NF- $\kappa$ B nuclear en comparación con bacterias no patógenas (figura 5).

20 La desaparición de I $\kappa$ B $\alpha$  (panel inferior) refleja la activación de la vía que conduce a la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B. A este respecto, si bien LPR solo tiene un efecto suave sobre la activación de NF- $\kappa$ B, la activación de LPR con SIgA o SC reduce la activación de NF- $\kappa$ B en células Caco-2 (no se sometió a ensayo BL818). La incubación de células epiteliales con *S. flexneri* patógeno condujo a la desaparición total de la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$ .

Los resultados se muestran en la figura 5.

25 Ejemplo 4:

• ACTIVIDAD ANTI-PATÓGENA

30 Se sembraron aproximadamente  $10^6$  células Caco-2 por  $1\text{ cm}^2$  de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 16 horas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  con  $2 \times 10^7$  UFC de LPR en ausencia de antibiótico o FCS. Se sometió a ensayo LPR solo o en combinación con  $0,2\text{ }\mu\text{g}$  de SC,  $1\text{ }\mu\text{g}$  de SIgA policlona o  $1\text{ }\mu\text{g}$  de LPS SIgAC5 anti-*S. flexneri* específico. Después de la incubación con LPR, las células se lavaron y después se incubaron con  $10^7$  *S. flexneri* durante 6 horas, se lavaron nuevamente y se incubaron con  $50\text{ mg/ml}$  de gentamicina durante 45 min. Finalmente, las células se sometieron a lisis y se enumeraron *S. flexneri* intracelulares sobre placas de agar LB. Se realizaron ensayos por triplicado para cada experimento.

40 La adición de LPR redujo la infección de la monocapa de células Caco-2 polarizadas por *S. flexneri* de manera dependiente de la dosis. El efecto aumento altamente por la combinación con SIgA. La prevención completa de infección se consiguió cuando se utilizó anticuerpo SIgAC5- específico de LPS de *S. flexneri* (figura 6).

Los resultados se muestran en la figura 6.

Ejemplo 5:

45 • EXPRESIÓN DE RECEPTOR DE IG POLIMÉRICO EN MONOCAPA DE CÉLULAS CACO-2 POLARIZADAS

50 Se sembraron aproximadamente  $10^6$  células Caco-2 por  $1\text{ cm}^2$  de filtro Transwell. Las células se incubaron durante 16 horas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  con  $2 \times 10^7$  UFC de LPR en ausencia de antibiótico o FCS. Los probióticos se sometieron a ensayo solos o en combinación con  $0,2\text{ }\mu\text{g}$  de SC,  $1\text{ }\mu\text{g}$  de SIgA policlona. *S. flexneri* de control se sometió a ensayo solo o en combinación con  $1\text{ }\mu\text{g}$  de SIgAc5-LPS anti-*S. flexneri*. Después del lavado, se recuperaron directamente células de Caco-2 de los filtros Transwell y se sometieron a lisis. Se retiraron los núcleos y residuos celulares, así como los citoplasmas se analizaron por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-pI $\text{gR}$  y anti-sueros de SC humano y  $\beta$ -actina como controles. Se realizaron ensayos por triplicado para cada experimento.

55 En un experimento posterior, se incubaron células siguiendo el mismo procedimiento, y después se recuperaron del filtro Transwell a las 8, 16 y 24 h de incubación. Se realizó un análisis cuantitativo de pI $\text{gR}$  por análisis ELISA sobre fracciones de residuos celulares/citoplasma. Las proteínas totales se determinaron por ensayo de proteínas BCA. Los valores se normalizaron al contenido de proteínas y los datos se expresaron como medias de  $\text{ng pI}\text{gR}/\text{mg}$  de proteína total  $\pm$  ETM.

60 La expresión de pI $\text{gR}$  en células epiteliales se normalizó a la expresión de  $\beta$ -actina. Como se manifestó por transferencia Western (panel superior) y análisis densitométrico de las bandas respectivas (panel inferior) hubo un incremento del nivel de pI $\text{gR}$  después de la exposición durante una noche de monocapas de Caco-2 polarizadas a combinaciones de LPR o BL818 con SIgA o SC en comparación con probióticos solos (figura 7a). SIgAC5-LPS anti-*S. flexneri* específico impidió la interacción del patógeno con la monocapa polarizada de células Caco-2, explicando de este modo la disminución de expresión de pI $\text{gR}$  en comparación con el tratamiento de *S. flexneri* solo.

Los resultados mostraron adicionalmente un incremento dependiente del tiempo del nivel de receptor de Ig polimérico (pIgR) después de la exposición de monocapas de células Caco-2 polarizadas a combinaciones probióticas con SIgA o SC (figura 7b).

- 5 Los resultados se muestran en la figura 7.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende SIgA y al menos un microorganismo probiótico, en la que la composición es una composición alimenticia destinada al consumo por los seres humanos, un producto alimenticio para animales, o una composición farmacéutica, en la que el SIgA y al menos un probiótico están presentes en forma de un complejo, y en la que dicho probiótico se selecciona entre el grupo que consiste en Bifidobacterias y Lactobacilus.
- 10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el microorganismo probiótico se selecciona entre el grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri* y mezclas de los mismos.
- 15 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el microorganismo probiótico se selecciona entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* (NCC533; CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (NCC490; CNCM I-2170), *Bifidobacterium longum* (NCC2705; CNCM I-2618), *Bifidobacterium lactis* (2818; CNCM I-3446), *Lactobacillus paracasei* (NCC2461; CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007; CGMCC 1.3724) y mezclas de los mismos.
- 20 4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición está destinada al consumo por lactantes, madres durante el embarazo o la lactancia, jóvenes, adultos o seres humanos mayores.
- 25 5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende, al menos, otro tipo de bacterias de calidad alimenticia.
- 30 6. Un producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto contiene adicionalmente, al menos, un prebiótico.
7. Un producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto se selecciona entre el grupo que consiste en: productos a base de leche en polvo; bebidas instantáneas; formulaciones listas para beber; polvos nutricionales; líquidos nutricionales; productos a base de leche, en particular yogures o helado; productos de cereales; bebidas; agua; café; capuchino; bebidas de malta; bebidas con sabor a chocolate; productos culinarios; sopas; comprimidos; y jarabes.

Figura 1:

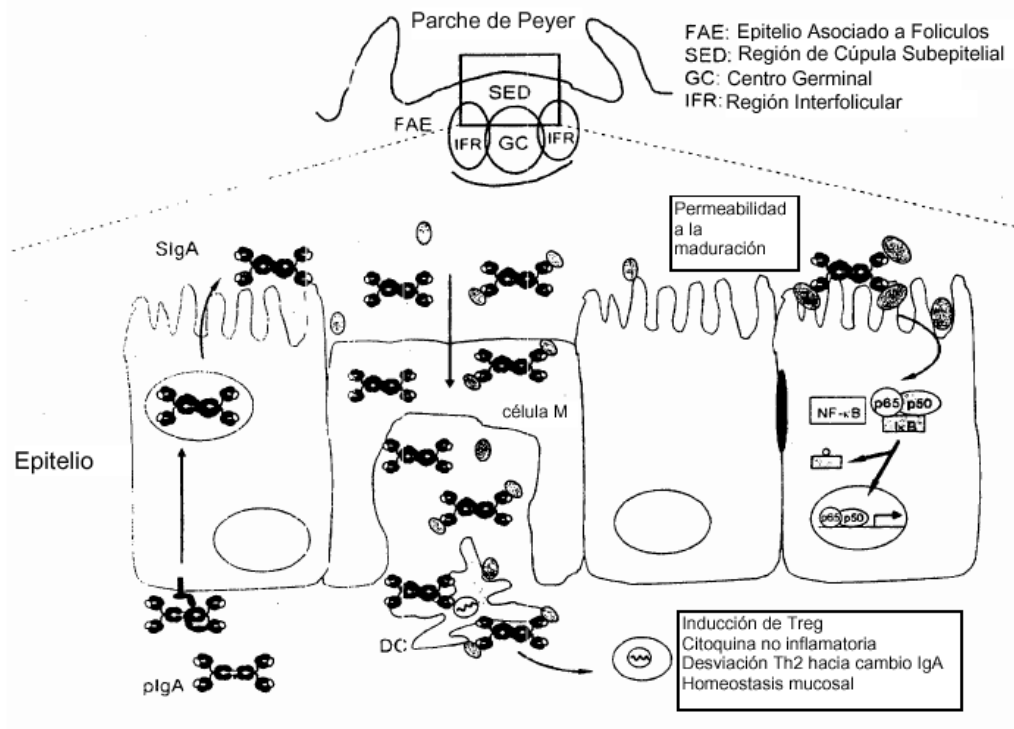


Figura 2:

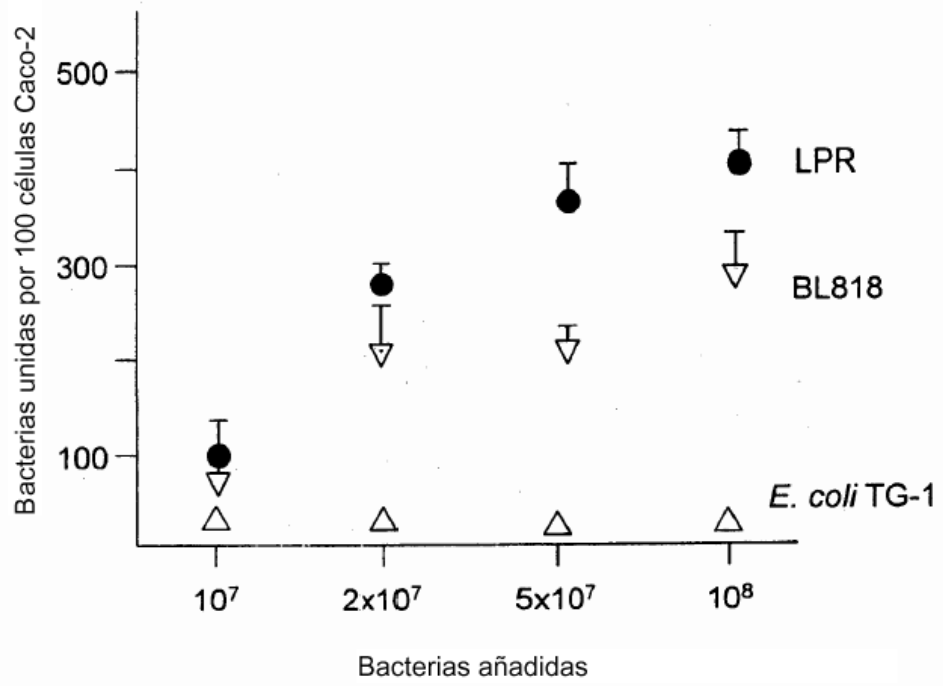
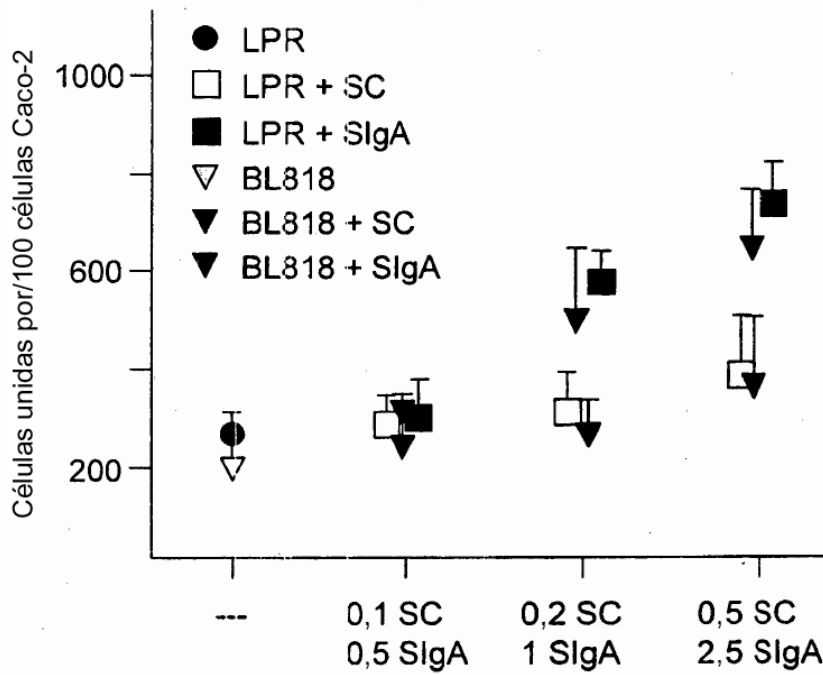


Figura 3:



$2 \times 10^7$  LPR o BL818 combinado con varias cantidades de SC/SlgA ( $\mu\text{g}$ )  
 Recordatorio: 1nM SC = 80 ng/ml; 1 nM SlgA = 400 ng/ml

Figura 4:

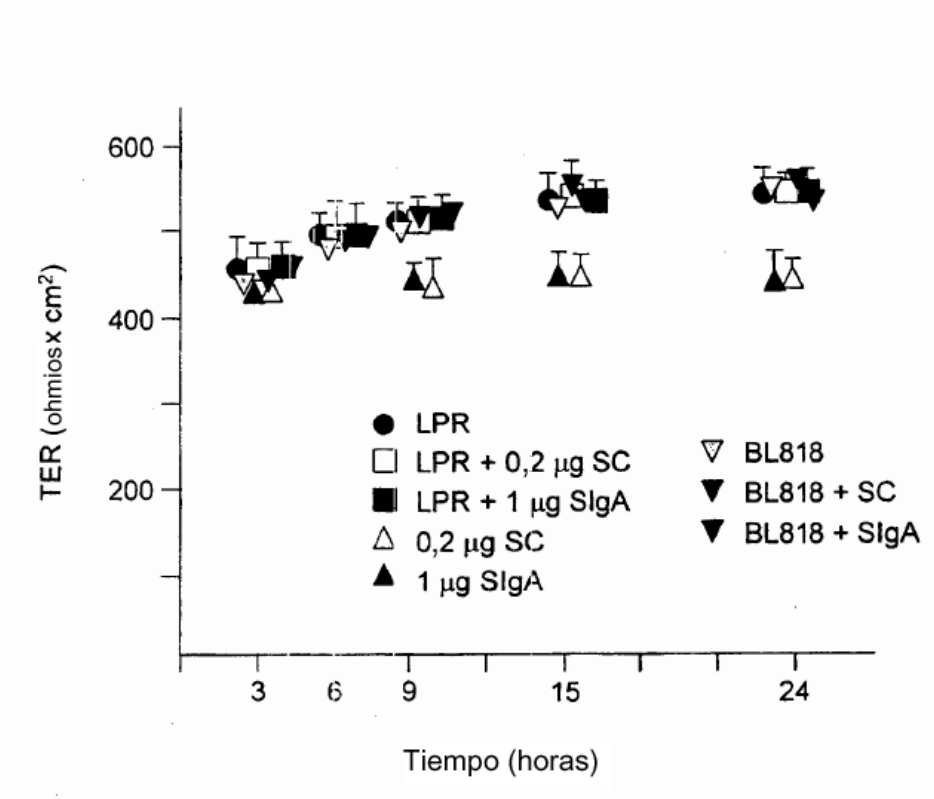


Figura 5

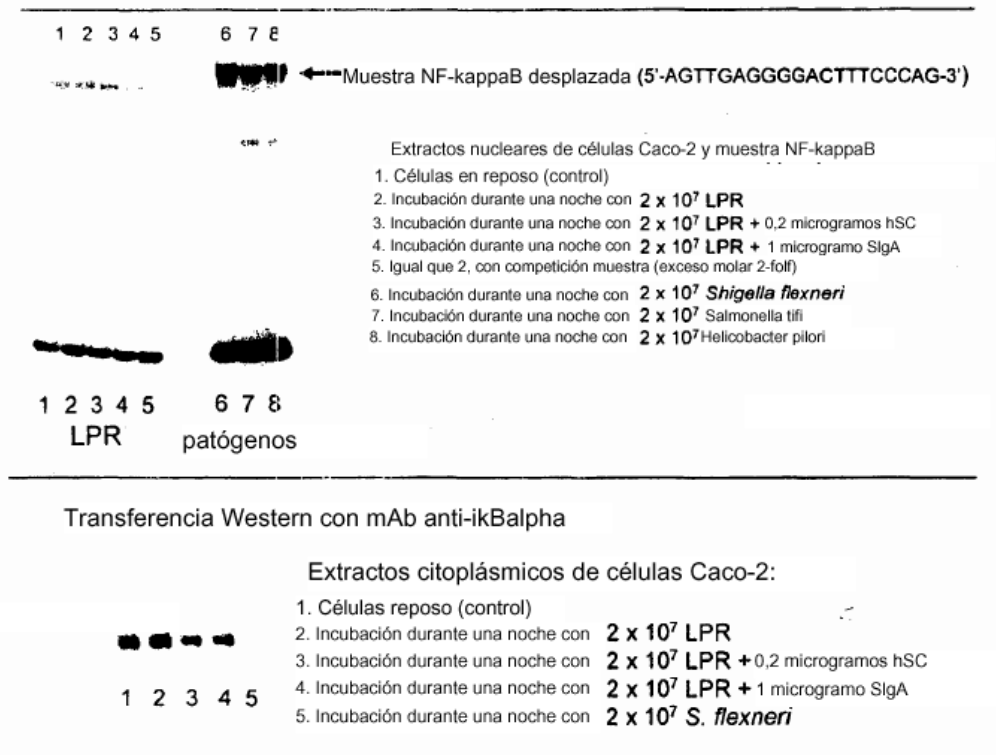


Figura 6:

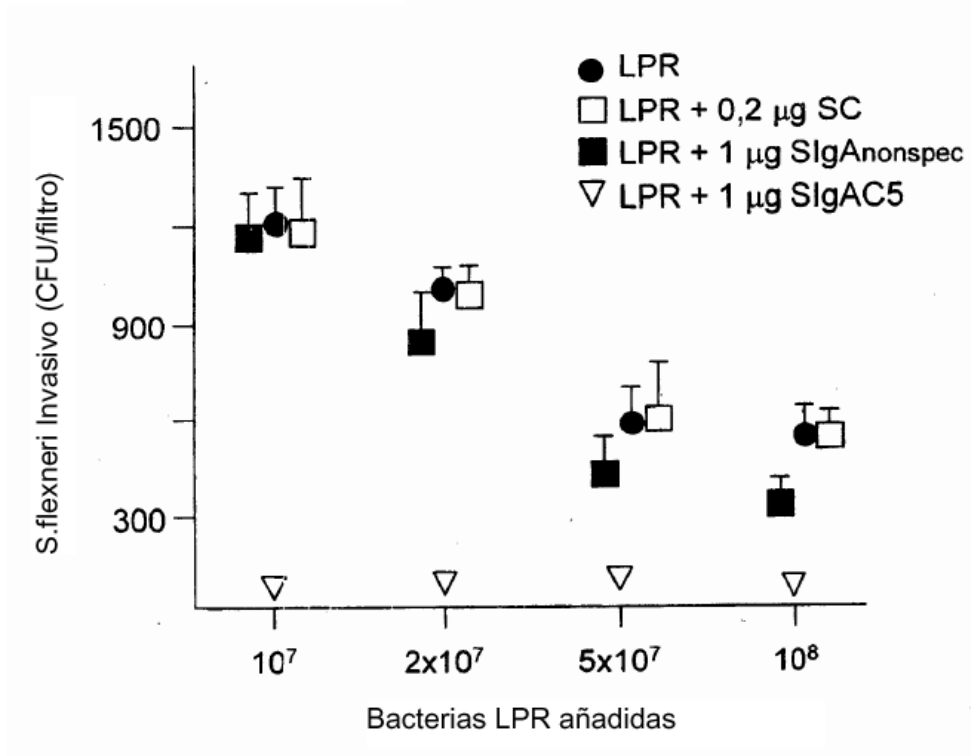


Figura 7:

