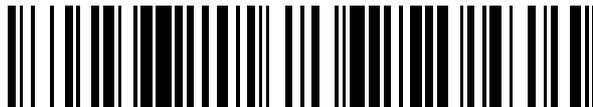


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 724**

51 Int. Cl.:

A23L 33/135 (2006.01)
A23L 33/125 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
A23L 33/18 (2006.01)
A23L 33/22 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2010 PCT/EP2010/061666**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11020748**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2010 E 10741961 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2467032**

54 Título: **Composición nutricional que comprende cepas de Bifidobacterium longum y que reduce los síntomas de alergia alimentaria, especialmente en lactantes y niños**

30 Prioridad:

18.08.2009 EP 09168049

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HOLVOET, SÉBASTIEN;
MERCENIER, ANNICK y
ZUERCHER, ADRIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 664 724 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

Composición nutricional que comprende cepas de *Bifidobacterium longum* y que reduce los síntomas de alergia alimentaria, especialmente en lactantes y niños

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de probióticos, especialmente cepas de *Bifidobacterium longum* en la preparación de una composición nutricional para reducir los síntomas alérgicos de pacientes alérgicos al exponerse a alérgenos.

Antecedentes de la invención

Las alergias son uno de los problemas de salud más comunes que afecta a la vida de los pacientes a cualquier edad. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que las enfermedades alérgicas constituyen una epidemia. Se ha demostrado que la prevalencia de las alergias se ha incrementado en las últimas décadas. El estilo de vida moderno, especialmente el urbano, se ha asociado a una prevalencia elevada y a una mayor gravedad de las manifestaciones alérgicas.

La sensibilización alérgica en la infancia, especialmente en la infancia temprana y especialmente a los alérgenos alimentarios, es crítica y del mayor interés ya que el desarrollo de un "fenotipo alérgico" o "atopia" se ha demostrado que facilita la posterior sensibilización a otros alérgenos. Por lo tanto, las alergias en la niñez pueden ser la primera etapa de una cascada alérgica que conduce a múltiples alérgicas posteriormente en la vida, un proceso comúnmente denominado "marcha atópica". Por ejemplo, se ha demostrado en cohortes humanas que los niños con hipersensibilidad alimentaria persistente en edades tempranas presentan un riesgo drásticamente incrementado de desarrollar rinitis alérgica (fiebre de heno) o asma posteriormente en la niñez (Ostblöm et al., 2008). Los niños con formas más leves de hipersensibilidad alimentaria también presentan un riesgo incrementado de desarrollo de alergias respiratorias pero menor grado que los niños con hipersensibilidad alimentaria persistente. Por lo tanto, atenuar la gravedad de la hipersensibilidad alimentaria puede resultar crucial para enlentecer la "marcha atópica". En este contexto, el control de los episodios alérgicos y la prevención de las alergias resultan, en la niñez y en la infancia, de la máxima importancia.

El sistema inmunológico del niño se encuentra en desarrollo activo durante los primeros años de vida. La acción o prevención, evitación, control, reducción o modulación de las reacciones alérgicas en dichos pacientes jóvenes puede influir sobre el perfil alérgico a corto plazo pero también a más largo plazo, posteriormente en la vida.

La prevención de las alergias puede conseguirse a diferentes niveles:

la "prevención primaria" es el efecto de prevención o reducción del riesgo de sensibilización de los pacientes frente a los alérgenos, caracterizada por la ausencia o niveles reducidos de anticuerpos IgE específicos de alérgeno. La prevención o reducción de la sensibilización resultará en la ausencia o en la reducción de los síntomas alérgicos con la exposición al mismo alérgeno. Mediante la modulación del modo en que un paciente resulta sensibilizado a un alérgeno o grupo de alérgenos (prevención primaria), también puede modularse la posterior respuesta alérgica.

La "prevención secundaria" es el efecto de modular los síntomas de las alergias, es decir, la aparición o la intensidad de la reacción alérgica en un paciente ya sensibilizado a uno o varios alérgenos al exponer nuevamente el paciente a dicho alérgeno o alérgenos. Mediante la modulación de la aparición o la intensidad de los síntomas alérgicos (prevención secundaria), se minimiza la incomodidad asociada a las alergias.

Dados estos claros conceptos de prevención de las alergias podría plantearse la hipótesis de que, en virtud de sus mecanismos de acción inherentes, algunos compuestos podrían actuar exclusivamente en uno o en los dos niveles específicos de prevención. Algunos pueden, por ejemplo, reducir únicamente la sensibilización a un alérgeno específico (prevención primaria), mientras que otros compuestos podrían presentar exclusivamente un efecto sobre la prevención secundaria y reducir la gravedad de las reacciones alérgicas. Otros compuestos podrían ser capaces de influir sobre tanto la sensibilización como los síntomas y, de esta manera, resultar eficaces en la estimulación de la prevención primaria y la prevención secundaria.

Los alérgenos alimentarios son de entre los primeros alérgenos a los que se expone el lactante al principio de su vida: típicamente el lactante no alimentado exclusivamente con leche materna se expone a las proteínas de la leche de vaca. Las proteínas de la leche en efecto son de entre las causas más frecuentemente observadas de alergia alimentaria en la infancia, seguidas de los huevos y las proteínas del trigo. En general, las alergias alimentarias pueden manifestarse por síntomas cutáneos (erupciones, eccema, otros) y gastrointestinales (espasmos abdominales, dolor, especialmente en el abdomen o vómitos) en lactantes y niños pequeños. También puede aparecer sensibilización y episodios adicionales de alergia al exponer el lactante/niño pequeño a un alimento nuevo tal como cereales, verduras, frutas, nueces o pescado.

Se ha descrito que algunas cepas de *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) desempeñan un papel importante en la microbiota intestinal y que se encuentran asociados a efectos positivos sobre la salud: típicamente se encuentran presentes en número elevado en la microbiota intestinal de lactantes sanos alimentados con leche materna. Pueden fomentar una buena digestión, reforzar el sistema inmunológico y producir ácido láctico y ácido acético que controlan el pH intestinal. Estas bacterias también pueden inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, *E. coli* y otras bacterias con características patogénicas. *B. longum* en general o cepas específicas de *B. longum* pueden clasificarse como probióticos según la definición de la OMS.

En cierta medida, se ha descrito que cepas específicas de *B. longum* presentan un efecto antialérgico. Por ejemplo, los pacientes que sufren de rinitis alérgica debido a la polinosis del cedro japonés mostraban síntomas alérgicos reducidos tras el consumo de *B. longum* BB536 durante varias semanas antes y durante la estación de polen (Xiao JZ, Kondo S, Yanagisawa N, Takahashi N, Odamaki T, Iwabuchi N, Miyaji K, Iwatsuki K, Togashi H, Enomoto K, Enomoto T. Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. Clin. Exp. Allergy 36(11):1425-35, nov. de 2006. Xiao JZ, Kondo S, Yanagisawa N, Takahashi N, Odamaki T, Iwabuchi N, Iwatsuki K, Kokubo S, Togashi H, Enomoto K, Enomoto T. Effect of probiotic Bifidobacterium longum BB536 [corrected] in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebo-controlled trial. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 16(2):86-93, 2006.

Además, se han descrito diversos cultivos probióticos o mezclas de probióticos para su efecto sobre el sistema inmunológico alérgico: por ejemplo la patente nº EP1858336 (documento nº WO2006/697949) describe una mezcla de probióticos que puede reducir el riesgo de alergias debidas a la albúmina y globulinas en la harina de trigo. El documento nº JP2006/028050 describe las propiedades supresoras de la alergia en la piel de composiciones que comprenden bacterias probióticas tales como *Lactobacillus* y *Streptococcus*. El documento nº WO2009/072889, de Jan Knoll et al., describe un *Bifidobacterium* que puede utilizarse en la mejora de la función pulmonar de sujetos que sufren de alergia a los ácaros del polvo. La patente nº JP10309178 sugiere cómo un *Bifidobacterium* originado en el ser humano puede ayudar a curar la alergia alimentaria o en la inducción de la tolerancia inmunológica peroral. MENARD O ET AL: "Gnotobiotic mouse immune response induced by *Bifidobacterium* sp. strains isolated from infants", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY FEBRUARY 2008 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, vol. 74, nº 3, febrero de 2008 (2008-02), páginas 660 a 666 y documento nº WO 2007/093619 A1 dan a conocer la utilización de *Bifidobacterium longum* NCC 2705 en la reducción de los síntomas alérgicos (alimentos). Sin embargo, sigue existiendo una necesidad de reducir específicamente las reacciones y síntomas alérgicos en la población de niños pequeños y lactantes. Lo anterior resulta especialmente importante al considerar la maduración de los sistemas intestinal e inmunológico que se producen en niños pequeños y al considerar la multiplicidad de nuevos alérgenos a los que se encuentran expuestos los niños pequeños, especialmente en el periodo en torno al destete.

La cuestión de las reacciones alérgicas producidas por alimentos a edades tempranas resulta complicada todavía más por las necesidades nutricionales específicas de los lactantes y niños pequeños. La ingesta calórica, la densidad calórica, la diversidad de nutrientes deseables, el contenido de proteínas y la calidad de las proteínas son todos factores importantes para proporcionar la mejor nutrición a lactantes y niños pequeños. La presencia de micronutrientes tales como vitaminas y minerales también resulta importante, más específicamente en el caso de que su concentración se encuentre limitada por intervalos recomendados específicos correspondientes a la edad de los pacientes objetivo. De esta manera, para los niños pequeños y lactantes, las matrices de administración alimentaria son inherentemente complejas aunque también presentan una menor diversidad: por ejemplo los lactantes, aunque potencialmente alérgicos, requieren habitualmente un contenido de proteínas específico en una matriz de proteínas derivadas de la leche. La presencia de dicha multiplicidad de nutrientes puede potenciar el efecto de los alérgenos alimentarios. En dichas matrices complejas, alérgenos alimentarios de perfil bajo que son incapaces de desencadenar una manifestación alérgica por sí solas pueden adquirir potencia en la inducción de una reacción alérgica. De manera similar, los compuestos que pueden neutralizar los alérgenos o actuar sobre la prevención de las alergias pueden ver su efecto disminuido o eliminado en dichas matrices nutricionales complejas. Específicamente no puede preverse si los compuestos que habitualmente se admite que actúan sobre la prevención de las alergias todavía se encuentran activos y en qué medida en matrices complejas tales como una composición nutricional para lactantes o niños pequeños.

Existe una necesidad de proporcionar un alivio de los síntomas de las alergias alimentarias a las poblaciones de lactantes y niños pequeños que presentan una historia de episodios alérgicos y/o que son alérgicos.

Existe una necesidad de proporcionar una composición nutricional completa que no sólo proporcione una diversidad de nutrientes sino que también reduzca la gravedad de las reacciones alérgicas.

Existe una necesidad de proporcionar una composición nutricional que module la reacción alérgica de pacientes jóvenes que sufren de formas leves a moderadas de alergia, ya que estos pacientes presentan necesidades especiales dictadas por la madurez incompleta de sus sistemas intestinal e inmunológico.

Existe una necesidad además de modular las reacciones alérgicas en los niños pequeños que no toleran las rigurosas moléculas farmacéuticas, por ejemplo mediante intervenciones nutricionales, tales como la inclusión de moduladores del sistema inmunológico en el régimen nutricional habitual.

5 Existe una necesidad de proporcionar una composición nutricional que module la reacción alérgica de pacientes jóvenes en el momento del destete y en torno al destete, cuando el tracto intestinal está experimentando una modificación sustancial y en un periodo de tiempo cuando se están introduciendo nuevos alimentos sólidos, que potencialmente contienen nuevas proteínas alérgicas, y por lo tanto, cuando el paciente es particularmente susceptible a la sensibilización a alérgenos alimentarios.

10 Existe una necesidad de alivio de los síntomas de las alergias mediante la provisión de una composición eficaz, posiblemente mediante la reducción de la exposición a alérgenos intactos, aunque la composición puede no reducir directamente la sensibilización a los alérgenos.

15 Existe una necesidad de una composición que presente un efecto positivo sobre la prevención secundaria de las alergias, no actuando necesariamente sobre la prevención primaria de dichas alergias.

20 Finalmente existe una necesidad de una composición más particularmente adecuada para pacientes jóvenes que, mediante la reducción de los síntomas, pueda ayudar a reducir el "fenotipo alérgico" y, de esta manera, pueda reducir posteriormente en la vida la sensibilización frente a nuevos alérgenos. Existe una necesidad de atenuación de la marcha atópica.

Descripción resumida de la invención

25 La invención se describe mejor mediante las reivindicaciones. En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición nutricional completa para reducir los síntomas de las alergias originadas a partir de los alimentos en pacientes que presentan alergias inducidas por alérgenos alimentarios, especialmente en pacientes jóvenes, lactantes y niños jóvenes.

30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que estimula significativamente la prevención secundaria de reacciones alérgicas inducidas por alérgenos alimentarios, opcionalmente no afectando a la prevención primaria contra los mismos alérgenos.

35 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende probióticos, especialmente pertenecientes a *Bifidobacterium longum* NCC 2705. En otro aspecto de la invención, la composición de la invención resulta especialmente eficaz para lactantes/niños pequeños en el momento del destete.

La invención se refiere además a la reducción de la sensibilización a los otros alérgenos posteriormente en la vida.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1/Tabla 1: perfil de citoquinas de CMSP humanas con predominancia de Th2 tras el cocultivo con *B. longum* NCC 2705 depositadas por Nestec SA con el nº CNCM-12618 u otras cepas.

45 Figura 2/Tabla 2: perfil de ARNm de CMSP humanas con predominancia de Th2 tras el cocultivo con *B. longum* NCC 2705 u otras cepas)

Figura 3: descripción esquemática del modelo de alergia alimentaria a OVA en el ratón

50 Figura 4: ilustración de puntuación clínica que muestra síntomas reducidos de alergia alimentaria en ratones que han recibido 5×10^8 UFC/ml de *B. longum* NCC 2705 en agua corriente.

Figura 5: niveles séricos de proteasa-1 de mastocito de ratón (MMCP-1, por sus siglas en inglés).

55 Figura 6/Tabla 3: producción de citoquinas por linfocitos de LN mesentéricos y esplenocitos estimulados nuevamente *ex vivo*.

Figura 7/Tabla 4: niveles de expresión génica en el fleon.

Descripción detallada de la invención

Definiciones: en la presente memoria, los términos siguientes presentan los significados siguientes:

65 "*Composición nutricional completa*". Para el propósito del presente documento, una composición nutricional completa es una composición que comprende una cantidad significativa, habitualmente 20% o más, de los nutrientes nutricionales principales para una edad dada. Dichos nutrientes principales habitualmente son

proporcionados en cantidad y proporción que permiten satisfacer 20% o más de las dosis de nutrientes recomendadas específicas para una edad dada al utilizarse en cantidad adecuada para proporcionar la ingesta calórica recomendada para una edad dada. Una composición nutricional completa habitualmente comprende una fuente de proteínas, una fuente de lípidos y una fuente de carbohidratos en una proporción equilibrada que cumple la recomendación general para una edad dada. Habitualmente incluye además micronutrientes, tales como vitaminas y minerales, así como una fuente de aminoácidos esenciales y una fuente de ácidos grasos esenciales. Sin embargo, se entiende que una composición nutricional completa no comprende todos los nutrientes específicos ni todas las cantidades recomendadas para satisfacer todas las necesidades nutricionales de un lactante o niño pequeño. Una composición nutricional completa excluye composiciones que comprenden meramente *Bifidobacterium* o *Bifidobacterium* en una proporción predominante.

La expresión “*síntomas de alergias*” generalmente incluye síntomas inducidos por alérgenos. Entre dichos síntomas se incluyen manifestaciones cutáneas (enrojecimiento de la piel, erupciones, prurito, dermatitis y eccema), oculares (prurito y lagrimeo de los ojos), gastrointestinales (congestión, dolor abdominal, cólicos, vómitos y diarrea), respiratorios (picor en la nariz, congestión nasal, rinitis y asma) y en casos severos, sistémicos (mareo, confusión mental y anafilaxis).

La “*prevención primaria de las alergias*” se refiere a todas las medidas destinadas a evitar o reducir la sensibilización alérgica (inmunológica), por ejemplo la prevención o reducción de los anticuerpos IgE específicos.

La “*prevención secundaria de las alergias*” se refiere a la prevención o reducción del desarrollo de síntomas de enfermedad alérgica/alérgicos en un individuo sensibilizado.

El “*periodo de destete*” es el periodo durante el que los lactantes se están adaptando de una alimentación totalmente líquida a la alimentación sólida o semisólida y que se están adaptando de un tipo alimentario casi único (generalmente leche materna o fórmula infantil) a una diversidad de alimentos.

La “*sensibilización*” se refiere a la inducción/desarrollo de anticuerpos IgE específicos de alérgeno.

El término “*probiótico*” se refiere a preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o bienestar del huésped. (Salminen S., Ouwehand A. Benno Y. et al., "Probiotics: how should they be defined", Trend Food Sci. Technol. 10:107-10, 1999). La definición de probiótico generalmente se admite y es conforme a la definición de la OMS. El probiótico puede comprender una cepa única de microorganismo, de una mezcla de diversas cepas y/o de una mezcla de diversas especies y géneros bacterianos. En el caso de mezclas, el término singular “probiótico” todavía puede utilizarse para referirse a la mezcla o preparación probiótica. Para el propósito de la presente invención, los microorganismos del género *Bifidobacterium* se consideran probióticos.

El término “*prebiótico*” generalmente se refiere a un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de los microorganismos presentes en el intestino del huésped y, de esta manera, intenta mejorar la salud del huésped.

La cepa de *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) NCC 2705 (Nestle Collection reference 2705) es la cepa de *B. longum* que presenta la referencia de identificación internacional CNCM-I2618 (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes at Institute Pasteur, Paris, Francia).

Los inventores han puesto de manifiesto que la reacción y síntomas alérgicos pueden aliviarse al proporcionar a mamíferos jóvenes sensibilizados una composición nutricional completa que comprende *B. longum* NCC 2705. Lo anterior define un efecto positivo sobre la prevención secundaria de las alergias.

Este efecto se ve acompañado por una reducción ligera aunque significativa de la sensibilización de los mamíferos jóvenes a alérgenos (es decir, se pone de manifiesto la prevención primaria de las alergias).

Efecto de la composición:

La invención se refiere a la utilización de microorganismos del género *Bifidobacterium*, más particularmente *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) y más específicamente la cepa *B. longum* NCC 2705 para la preparación de una composición nutricional completa para la reducción de los síntomas en pacientes que presentan alergias inducidas por alérgenos alimentarios. Los inventores han puesto de manifiesto que el consumo de *Bifidobacterium longum* in general y de *B. longum* NCC 2705 en particular conduce a síntomas reducidos de alergia alimentaria en un grupo de ratones que recibe una composición nutricional que contiene dicha cepa de *Bifidobacterium*. Lo anterior se pone de manifiesto al inducir una reacción (reto) alérgica tras la sensibilización. El modelo imita la alergia alimentaria en el ser humano, cuando el ser humano (típicamente lactantes/niños pequeños) resulta naturalmente sensibilizado por alérgenos alimentarios y después resulta nuevamente expuesto a dichos alérgenos. Por lo tanto, la cepa bacteriana *B. longum* NCC 2705 muestra un efecto protector.

En una realización de la invención, el efecto de la composición es más específicamente un efecto sobre la prevención secundaria de las alergias. Los síntomas de las alergias, en el modelo del ratón, en efecto resultan reducidos significativamente, tal como ilustra una puntuación clínica alérgica más baja. Generalmente los síntomas pueden incluir la totalidad o una selección de los síntomas habitualmente reconocidos de las alergias.

En una realización de la invención, los síntomas comprenden diarrea, irritación de la piel o síntomas respiratorios o combinaciones de los mismos.

En una realización de la invención, los síntomas pueden verse acompañados de una liberación de mediadores bioquímicos, tales como una triptasa, quimasa, histamina o leucotrienos.

En una realización de la invención, la composición también presenta un efecto sobre la sensibilización de los pacientes a los alérgenos. En efecto, aparentemente se consigue una prevención primaria leve aunque significativa de las alergias con la composición que comprende *B. longum* NCC 2705. Los animales mostraron una menor sensibilización a los alérgenos alimentarios. El efecto de la composición es a este respecto de elevado interés ya que reduce los síntomas y reduce la sensibilización, es decir, el riesgo de síntomas posteriores tras la nueva exposición a los alérgenos.

En una realización, la composición reduce la sensibilización a otros alérgenos posteriormente en la vida. Se cree que la composición estimula (o por lo menos no bloquea) los procesos naturales de maduración inmunológica y, por lo tanto, es capaz de presentar un efecto a largo plazo sobre la reducción de la sensibilización a los mismos alérgenos o a diferentes alérgenos (reducción de la sensibilización posteriormente en la vida). Mediante la reducción de los síntomas de alergia (prevención secundaria) y la sensibilización a corto plazo (como parte de la prevención primaria), se plantea la hipótesis de que la composición de la invención todavía puede permitir que se produzca una maduración inmunológica natural y presentar dicho efecto beneficioso a largo plazo.

Composición de la invención o para la utilización en la invención

La composición de la invención puede ser una composición nutricional completa, tal como una fórmula infantil o puede proporcionar una parte sustancial de la dieta completa. Preferentemente, la composición es una composición nutricional completa que proporciona la totalidad o prácticamente la totalidad de los requisitos nutricionales del cuerpo diana al ingerirse como fuente exclusiva de nutrientes. En una realización, la composición comprende cereales para lactantes. En otra realización, tal como un alimento para lactantes, la composición proporciona una parte de la dieta completa, preferentemente 50% o más, o 20% o más (cuantitativa y cualitativamente). En una realización, la composición comprende cereales para lactantes. En una realización la composición puede ser una composición líquida para niños que comprende cereales o un alimento para lactantes.

El probiótico utilizado es de la cepa *Bifidobacterium longum* NCC 2705. Aunque la invención no puede excluir que otros probióticos presenten un efecto similar o relacionado, los datos experimentales no han podido demostrar que otros géneros o cepas de probióticos resulten igualmente eficaces, aparte del efecto observado con *Lactococcus lactis* NC 2287 (SL131) CNCM 1-4154 y *Lactococcus lactis* NCC 2180 (SL60) CNCM I-4199 descrito en la solicitud copendiente por los mismos inventores.

En una realización de la invención, la composición comprende entre 10^4 y 10^{11} unidades formadoras de colonia (UFC) por cada g de composición seca. En el caso de que la composición sea una fórmula infantil, la cantidad de probiótico en la fórmula infantil puede ser de entre 10^5 y 10^8 UFC/g de fórmula infantil. En una realización, la composición comprende entre 10^6 y 5×10^7 UFC/g, que se encuentran en una dosis que se ha demostrado que presenta un efecto fisiológico. En una realización se ha identificado que los probióticos a una dosis baja pueden presentar un efecto beneficioso, en particular en el caso de que la composición comprenda además prebióticos y proteínas en una cantidad limitada definida. En dicha realización los probióticos se encuentran presentes en la composición en una cantidad de entre 10^3 y 10^5 UFC/g. Los prebióticos pueden ser oligosacáridos y/o las proteínas pueden encontrarse presentes en una cantidad no superior a 4 g/100 kcal, o inferior a 2 g/100 kcal o inferior a 1,8 g/100 kcal o inferior a 1,5 g/100 kcal de la composición.

El probiótico puede mezclarse con la composición seca o húmeda de la invención. Pueden aplicarse tratamientos o procedimientos específicos para mejorar la estabilidad o viabilidad de los probióticos en la composición. El probiótico puede aplicarse en una forma seca o en una forma húmeda. Tras mezclar el probiótico con la composición, la mezcla puede procesarse de una manera que no afecte drásticamente a la viabilidad de los probióticos. En otra realización, los probióticos se encuentran parcial o totalmente inactivados antes, durante o después de la mezcla. En una realización, los probióticos se han convertido en inactivos y/o incapaces de replicarse antes de la utilización en la composición de la invención. Lo anterior puede conseguirse, por ejemplo, mediante tratamiento térmico u otros tratamientos descritos.

En una realización de la invención, la composición comprende prebióticos. Es conocido que los prebióticos comprenden carbohidratos y más específicamente, oligosacáridos. Además, es conocido que han sido ampliamente utilizados como ingredientes alimentarios funcionales. Resisten la hidrólisis por enzimas del tracto digestivo humano,

pueden alcanzar el colon sin degradar y proporcionan una sustancia carbohidrato particularmente adecuada para el crecimiento de las bifidobacterias y otros probióticos. Los oligosacáridos pueden producirse, por ejemplo, a partir de glucosa, galactosa, xilosa, maltosa, sacarosa, lactosa, almidón, xilano, hemicelulosa, inulina o una mezcla de los mismos. Los productos prebióticos purificados disponibles comercialmente, tales como los fructooligosacáridos, contienen más de aproximadamente 95% de sólidos en forma de oligosacáridos.

Preferentemente, una realización de la composición es una composición nutricional que comprende por lo menos un prebiótico.

Preferentemente, una realización del prebiótico comprende un oligosacárido producido a partir de glucosa, galactosa, xilosa, maltosa, sacarosa, lactosa, almidón, xilano, hemicelulosa, inulina o una mezcla de los mismos. Más preferentemente, el oligosacárido comprende fructooligosacárido. Más preferentemente, el prebiótico comprende una mezcla de fructooligosacárido e inulina. Preferentemente, dicha mezcla comprende PREBIO1® o una mezcla de RAFTILOSE® y RAFTILINE® disponibles comercialmente.

Preferentemente, una realización del componente prebiótico de la composición comprende entre aproximadamente 50% y aproximadamente 90% de fructooligosacárido. Más preferentemente, comprende entre aproximadamente 60% y aproximadamente 80% de fructooligosacárido. Más preferentemente, comprende aproximadamente 70% de fructooligosacárido. Preferentemente, una realización del prebiótico comprende entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50% de inulina. Más preferentemente, comprende entre aproximadamente 20% y aproximadamente 40% de inulina. Más preferentemente, comprende aproximadamente 30% de inulina. En una realización, el componente prebiótico puede representar entre aproximadamente 0,1% y 10% de la composición.

En una realización, la composición de la invención comprende además un extracto de manzana que comprende polifenoles. El extracto de manzana puede ayudar a reducir los síntomas de alergias originadas en alimentos en pacientes que presentan alergias inducidas por alérgenos alimentarios. De esta manera, el extracto de manzana actúa de un modo sinérgico con el probiótico *Bifidobacterium* para modular, reducir o atenuar las alergias en pacientes que presentan alergias alimentarias. En una realización, se utiliza dicha composición para alimentos para lactantes y/o cereales para lactantes que representan naturalmente un portador adecuado para la composición. En una realización adicional, el alimento para lactantes o los cereales para lactantes comprende extractos de manzana o material procedente de manzanas. En una realización de la invención, el extracto de manzana es el extracto de proteína comercializado por val de Vire Bioactives (Conde sur Vire, Francia) con la referencia "Pomactiv HFV". En una realización, el extracto de manzana es similar o derivado del citado Pomactiv HFV y presenta un efecto similar.

Mecanismo hipotético de acción:

Las enfermedades alérgicas se han incrementado constantemente durante las últimas décadas y actualmente la OMS las considera una epidemia. De manera general, se considera que la alergia es el resultado de un desequilibrio entre las respuestas de Th1 y de Th2 del sistema inmunológico que conduce a una fuerte predominancia de producción de mediadores de Th2. Por lo tanto, sin respaldo teórico, se plantea la hipótesis de que la alergia podría mitigarse, regularse negativamente o evitarse mediante la restauración de un equilibrio adecuado entre los brazos de Th1 y Th2 del sistema inmunológico. Lo anterior implica la necesidad de reducir las respuestas de Th2 o de potenciar, por lo menos transitoriamente, las respuestas de Th1. Las primeras podrían caracterizarse por una producción reducida de citoquinas Th2, tales como IL-5; las últimas podrían caracterizarse por una producción incrementada de citoquinas Th1, tales como IFN γ . Alternativamente, en un individuo sensibilizado, un efecto antiinflamatorio general podría resultar más deseable, por ejemplo mediante la inducción de células T reguladoras (T_{reg}), capaces de modular negativamente los efectos de las células tanto Th1 como Th2. Lo anterior podría estar indicado por la capacidad de inducción de la secreción de IL-10.

En una realización de la invención, la composición comprende proteínas hidrolizadas o parcialmente hidrolizadas. Una composición nutricional basada en proteínas (parcialmente) hidrolizadas resulta particularmente adecuada para el sistema inmunológico y el tracto gastrointestinal de lactantes/niños pequeños debido a que las proteínas hidrolizadas resultan más fácilmente digeridas y presentan una alergenicidad reducida en comparación con las proteínas intactas. Además, sin respaldo teórico puede plantearse la hipótesis de que las proteínas hidrolizadas podrían ser un sustrato preferible para los probióticos o bacterias intestinales (especialmente las que expresan una diversidad de actividades de peptidasa) en comparación con proteínas intactas, conduciendo a un efecto mejorado de la cepa probiótica y, de esta manera, a sinergia entre las proteínas hidrolizadas y los probióticos. Lo anterior representa una composición muy apropiada para el sistema inmunológico y el tracto gastrointestinal de un lactante/niño pequeño con alergia alimentaria. En este caso, la combinación de *B. longum* NCC 2705 con proteínas hidrolizadas resulta de la máxima relevancia para la invención.

En una realización, las proteínas hidrolizadas son proteínas hidrolizadas del suero y/o la caseína. En una realización, las proteínas hidrolizadas resultan de la acción de la tripsina y/o la quimotripsina sobre las proteínas (esp. las proteínas del suero). En una realización, las proteínas hidrolizadas comprenden proteínas de la soja y/o proteínas del huevo. En una realización, las proteínas hidrolizadas resultan de la acción de proteasas tales como Protamex® y/o Flavourzyme® (Novozyme, Dinamarca). En una realización, las proteínas de la composición,

preferentemente las proteínas hidrolizadas, comprenden proteínas de cereales o de huevos. En una realización, las proteínas hidrolizadas resultan de la acción de la alcalasa. La composición de la invención puede comprender una mezcla de 2 o más de las fuentes de proteínas citadas.

5 Grupo objetivo:

La composición de la invención está dirigida más adecuadamente a pacientes relativamente jóvenes, aunque no se excluye o resulta posible un efecto sobre adultos. Preferentemente en efecto los pacientes son suficientemente jóvenes para encontrarse todavía pasando por una etapa de maduración de su sistema inmunológico y su tracto gastrointestinal. En estos pacientes el efecto de la composición puede ser más intenso o más rápido. En una realización, la composición es una fórmula infantil, cereales para lactantes y/o un alimento para lactantes. Preferentemente, la composición está dirigida a seres humanos jóvenes de menos de 6 años de edad, entre el nacimiento y la edad de 3 años o entre el nacimiento y el destete. En una realización, la composición es una fórmula infantil de inicio o una fórmula infantil de continuación. Preferentemente, la composición nutricional comprende una vasta mayoría de los nutrientes necesarios para la alimentación del ser humano joven.

En una realización, la composición nutricional es una composición de cereales para lactantes destinada a lactantes/niños jóvenes de 1 a 4 años de edad. La composición puede estar dirigida y administrarse más específicamente durante el periodo de destete y/o hasta los 12 meses posteriores. El periodo de destete resulta en efecto importante con respecto a la invención ya que los lactantes se encuentran expuestos a una diversidad de alimentos durante el periodo de destete mientras todavía experimentan la maduración y reorganización de su sistema inmunológico y tracto gastrointestinal. Por lo tanto, el control eficaz de la respuesta alérgica resulta de particular importancia durante ese periodo.

Con respecto a la utilización de la composición de la invención, los niños, bebés o lactantes pueden ser alérgicos. Los niños alérgicos son aquellos niños, bebés o lactantes que han experimentado por lo menos un episodio de reacción alérgica (leve, moderada o severa) a un alérgeno alimentario. En una realización de la invención, los niños, bebés o lactantes presentan alergias severas declaradas a alérgenos alimentarios y/o han experimentado más de un episodio moderado o severo de alergia alimentaria. Entre los síntomas de las alergias pueden incluirse diversos síntomas conocidos tales como la irritación o el enrojecimiento cutáneos, síntomas gastrointestinales o síntomas respiratorios.

Los alérgenos alimentarios comprendidos en la presente invención pueden incluir todos los tipos de alérgenos naturalmente presentes o habitualmente observados en los alimentos, especialmente los alimentos para seres humanos jóvenes (por ejemplo lactantes, bebés y niños).

Resultados experimentales:

Los probióticos, predominantemente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, han sido sometidos a ensayo en ensayos humanos y animales para su capacidad de interferir con la sensibilización alérgica o con el desarrollo de síntomas alérgicos en individuos sensibilizados. Los presentes inventores analizaron si una cepa particular de *B. longum*, verbigracia *B. longum* NCC 2705, presentaba el potencial de mitigar el desarrollo de sensibilización o síntomas de alergia.

En una etapa inicial los presentes inventores desarrollaron y utilizaron un sistema *in vitro* basado en linfocitos sanguíneos humanos para determinar los perfiles de citoquinas inducidos por diferentes cepas de *B. longum*. Los presentes inventores asumieron que los perfiles observados serían predictivos de la producción de citoquinas inducida *in vivo* por las mismas cepas y, de esta manera, de los efectos biológicos producidos por dichas cepas. Las células de un individuo alérgico o de un individuo con tendencia al desarrollo de alergias se caracterizan por su propensión a producir citoquinas Th2. Con el fin de imitar parcialmente este estado *in vitro*, los presentes inventores desarrollaron un modelo de cultivo celular de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas con predominancia de Th2 como alternativa a la utilización de CMSP de donantes alérgicos. La predominancia de Th2 fue inducida mediante el cultivo de las CMSP con interleuquina (IL)-4 + anticuerpo anti-CD40 (tal como se detalla en la sección de Métodos); tras 3 días de cultivo para inducir la predominancia de Th2, se añadieron bifidobacterias durante 48 horas adicionales, resultando en una duración total del cultivo de 5 días. Como lectura básica se midieron las citoquinas IFN- γ , IL-20 e IL-5 mediante ELISA en el sobrenadante de células estimuladas con *B. longum*.

La figura 1/Tabla 1 muestra que *B. longum* NCC 2705 indujeron cantidades similares de IFN- γ e IL-10, conduciendo a una proporción IFN- γ /IL-10 de 1,3. Otras cepas de *B. longum* analizadas en paralelo, tales como *B. longum* NCC 3001 (BB536; depositada por Morinaga con n° ATCC BAA-999 y *B. longum* NCC 435 (BL23, n° ATCC 15707) presentaban proporciones IFN γ /IL-10 con mayor predominancia de IFN γ . Además, *B. longum* NCC 2705 era un inhibidor eficiente de secreción de IL-5. Estos datos sugieren que *B. longum* NCC 2705 es un productor robusto de IL-10 bajo condiciones de predominancia de Th2 y, por lo tanto, podría presentar un efecto antialérgico mediante la actividad antiinflamatoria.

65

La figura 2/Tabla 2 muestra la confirmación de estos resultados sobre el nivel de ARNm para *B. longum* NCC 2705 en comparación con *B. longum* BB536 y LPS (de *E. coli*). Los niveles de expresión de diversos genes se analizaron 10 y 24 horas después de iniciar cocultivos de CMSP humanas con predominancia de Th2 con los diferentes estímulos. El cultivo de CMSP con predominancia de Th2 con *B. longum* NCC 2705 o NCC 3001 (BB536) condujo a una inducción moderada de IFN- γ en comparación con LPS, un inductor fuerte conocido de IFN- γ . Los niveles de ARNm de IL-10 inducidos por *B. longum* NCC 2705 eran más elevados que los inducidos por *B. longum* BB536. Los niveles de ARNm de IL-5 no resultaron afectados, mientras que el nivel de GAT-3 se redujo ligeramente tras la incubación con cualquiera de las cepas. Globalmente estos resultados confirman los resultados obtenidos al nivel de las proteínas (Tabla 1).

El efecto *in vivo* de *B. longum* NCC 2705 se sometió a ensayo en un modelo de alergia alimentaria en el ratón (modelo de ratón de alergia alimentaria a OVA, ilustrado en la fig. 3).

Se sensibilizaron los ratones BALB/c a intervalos semanales con ovoalbúmina (OVA) + toxina del cólera por la vía oral durante 7 semanas. En dicho modelo, el reto oral con una dosis grande OVA al final del periodo de sensibilización condujo a síntomas clínicos, tales como diarrea, episodios de rascado, pelaje erizado, cianosis y pérdida de movilidad.

Se administró NCC 2705 en ratones mediante agua corriente (5×10^8 UFC/ml, *ad libitum*) durante la etapa de sensibilización entre los días 1 y 43 (prevención primaria) durante la última semana de los experimentos (días 43 a 50, prevención secundaria) o durante todo el ensayo (días 1 a 50, la totalidad del periodo).

La figura 4 muestra los síntomas clínicos observados en dos experimentos individuales. Los ratones tratados con *B. longum* NCC 2705 desarrollaron síntomas clínicos significativamente menos severos tras el reto que los animales no tratados sensibilizados (control positivo). El efecto fue más pronunciado en la prevención secundaria aunque todavía significativo en la prevención primaria y al administrar *B. longum* NCC 2705 durante todo el periodo (experimento 1, panel superior). En un segundo experimento, se corroboró el efecto protector en la prevención secundaria, mientras que se observaron tendencias del efecto en la prevención primaria o durante todo el periodo (experimento 2, panel inferior).

Tal como se muestra en la figura 5, además de la puntuación clínica, se determinaron los niveles séricos de proteasa-1 de mastocito de ratón (MMCP-1, por sus siglas en inglés) como medida de la activación de los mastocitos intestinales por el reto con alérgeno. El reto con OVA condujo a un fuerte incremento de los niveles séricos de MMCP-1 en el grupo de control positivo en comparación con el grupo de control negativo. Se observó una tendencia en la modulación de los niveles séricos de MMCP-1 (aunque no significativa) en los ratones tratados con NCC 2705 en comparación con el grupo de control positivo.

La figura 6/Tabla 3 muestra la producción de citoquinas por linfocitos estimulados nuevamente *ex vivo*. Con este fin se recolectaron linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) tras el reto, se estimularon nuevamente con 1 mg/ml de OVA y se cultivaron durante 72 horas. Se midieron los niveles de IL-1, IL-2, IL-4, KC, TNF α , IFN- γ , IL-5 e IL-10 mediante ensayo multiplex (Mesoscale®). Los linfocitos de MLN de los ratones tratados con NCC 2705 en prevención primaria produjeron menos IL-2, IL-4, TNF α , IFN- γ , IL-5 e IL-10 que el control positivo.

Los niveles de expresión en el intestino de diversos genes asociados a alergia se determinaron mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR, ver el método, posteriormente). Las mediciones de la expresión génica se llevaron a cabo en tejidos de íleon para el grupo de control positivo, el grupo de control negativo y el grupo receptor de *B. longum* NCC 2705 durante el periodo de sensibilización (prevención primaria) y durante la última semana anterior al reto (prevención secundaria). La figura 7/Tabla 4 ilustra los resultados obtenidos: la sensibilización condujo a una regulación positiva de la transcripción de ARNm para las citoquinas Th2 típicas, tales como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (control neg. vs. control pos.) así como IL-10. El tratamiento con NCC 2705 (prevención primaria o secundaria) condujo a una marcada regulación negativa de dichos marcadores. Por lo tanto, los experimentos demuestran la modulación negativa de las respuestas inmunológicas mediante la reducción de la expresión de los genes relevantes al recibir los animales *B. longum* NCC 2705 (prevención primaria y secundaria). Se cree que lo anterior podría contribuir al efecto antialérgico de la cepa sometida a ensayo de *Bifidobacterium* en la reducción de la alergia alimentaria en este modelo.

Conclusión: Estos datos demuestran que el consumo de *B. longum* NCC 2705 por un animal sensibilizado conduce a síntomas alérgicos reducidos con la exposición al alérgeno sensibilizante. De manera similar aunque menos marcada, el consumo de *B. longum* NCC 2705 durante la etapa de sensibilización presentó un efecto protector (prevención primaria). Este resultado se encontró en paralelo con una secreción reducida de citoquinas por las células de ganglio linfático mesentérico, así como una expresión reducida de genes clave relacionados con la alergia en el intestino, sugiriendo que una modulación de los componentes del sistema inmunológico contribuía al efecto protector.

Métodos analíticos:Reactivos y biomasa bacteriana:

- 5 Se producto biomasa bacteriana mediante el cultivo de cada cultivo bajo condiciones óptimas en cultivos líquidos. Se determinó la cinética de crecimiento para cada cepa y de acuerdo con ella, se recolectó la biomasa 3 h después de alcanzar la etapa estacionaria. En este punto temporal, se lavaron los cultivos 2x en PBS frío y se congelaron en PBS y glicerol al 20% a -80°C en alícuotas de 50 µl. Se obtuvo LPS (de *E. coli*) de Sigma (Buchs, Suiza).

10 Aislamiento y cultivo de CMSP con predominancia de Th2:

- 15 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de filtros obtenidos del "Centre de Transfusion of the CHUV". Las células atrapadas en los filtros se enjuagaron hacia la bolsa de recolección de sangre con 90 ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, por sus siglas en inglés) (Sigma). Las células se diluyeron 1:1 con HBSS y las CMSP se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad en Histopaque 1077 (Sigma). Se recolectaron las células de la interfase y se lavaron dos veces con HBSS. Las CMSP se resuspendieron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (cIMDM, por sus siglas en inglés) (Sigma) complementado con FBS de suero bovino fetal al 10% (Bioconcept, Paris, Francia), L-glutamina al 1% (Sigma), penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma) y gentamicina al 0,1% (Sigma). Las células se cultivaron en una placa de 48 pocillos (Milian, Meyrin, Suiza) a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml en presencia de 50 ng/ml de IL-4 (Bioconcept) y 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD40 (R&D Systems, Abington, Inglaterra) en cIMDM para inducir un fenotipo de citoquina Th2. Se utilizó LPS a una concentración de 1 µg/ml. Tras 3 días de cultivo, se añadieron probióticos a razón de 10^7 , 10^6 y 10^5 UFC/ml. Tras añadir ingredientes, se continuó con el cultivo de las CMSP durante 48 h adicionales, resultando en una duración total del cultivo de 5 días.

25 ELISA de citoquinas:

- 30 Se midieron las citoquinas IFN-γ humana, IL-5 humana, IL-10, humana, IFN-γ de ratón, IL-13 de ratón e IL-10 de ratón utilizando kits DuoSet de R&D Systems siguiendo las instrucciones del fabricante.

Evaluación de los resultados de ELISA:

- 35 Se transformaron los valores de DO a pg/ml utilizando las curvas patrón. Para realizar ajustes para la gran variación de donante a donante generalmente observada con las CMSP de diferentes donantes humanos, se estandarizaron los datos respecto a un estándar interno arbitrario. El valor de pg/ml de IFN-γ obtenido para cada donante mediante la estimulación con LPS se fijó en 100%. Para la normalización de los valores de IL-10, se consideró que la cantidad de IL-10 inducida con la cepa *B. lactis* NCC 2818 (depositada por Nestec SA con la ref. CNCM-I3446) era de 100%. Finalmente, la cantidad de IL-5 inducida con IL-4 y anticuerpo anti-CD40 en medio solo (es decir, en ausencia de probióticos) se fijó en 100%.

40 Niveles cuantitativos de expresión génica mediante PCR en tiempo real:

- 45 Se cultivaron CMSP ($1,5 \times 10^6$ células/ml) en cIMDM con IL-4 (50 ng/ml y anti-CD40 (1 µg/ml) durante 3 días. Después, se añadieron los ingredientes a las CMPS y las células se recolectaron tras 10 h y 24 h. Se extrajo el ARN total de las CMSP estimuladas con el kit del sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Wallisellen, Suiza), incluyendo un tratamiento de ADNasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ARN total utilizando el kit de cuantificación de ARN Ribogreen (Molecular Probes, Basel, Suiza). Se llevó a cabo la transcripción inversa con 1 µg de ARN total mediante la utilización del kit de transcriptasa inversa Multiscribe (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se mezcló el ARN total con 50 µM de hexámeros aleatorios, 0,5 mM de dNTP, 20 U de inhibidor de ARNasa (Applied Biosystems), 62,5 U de transcriptasa inversa Multiscribe, tampón IX RT y 5,5 mM de MgCl₂ en un volumen final de 100 µl. Se cuantificó IFN_γ, IL-10, IL-5, Tbet, GATA3 y FoxP3 humanos (Applied Biosystems) mediante PCR en tiempo real (Applied Biosystems, ABI PRIS 7900HT) utilizando los ensayos de expresión génica Taqman. La cuantificación se normalizó respecto al a media de 3 genes de mantenimiento: β-actina, GAPDH y HPRT (Applied Biosystems).

- 55 Basándose en los valores de umbral de ciclo (Ct), se determinó una expresión de ARNm relativa y normalizada para cada gen utilizando el ΔCt. El valor Ct para cada gen se corrigió con la Ct media de los tres genes de mantenimiento. Los resultados se calcularon como expresión relativa utilizando la fórmula $2^{-\Delta Ct} \times K$.

60 Modelo de alergia alimentaria a OVA en el ratón:

- 65 Todos los estudios fueron aprobados por el comité interno de ética de Nestec y el Service Vétérinaire del cantón de Vaud, Suiza (autorización n° 1970). Se sensibilizaron ratones BALB/c convencionales hembra de seis semanas (Harlan Laboratories, Francia) mediante la vía oral (con una sonda nasogástrica) a intervalos semanales de 20 mg de ovoalbúmina (OVA) de Fluka (Buchs, Suiza) +10 µg/ratón de toxina del cólera (utilizada como adyuvante; List Biologicals, obtenida de LuBioscience, Lucerne, Suiza) durante 7 semanas. Una semana después de la última

sensibilización se llevó a cabo un reto oral con 100 mg de OVA. Se llevó a cabo la intervención nutricional con *B. longum* NCC 2705 (5×10^8 UFC/ml en agua corriente) en diferentes etapas del experimento: para la prevención primaria, durante el periodo de sensibilización; para la prevención secundaria, desde el final de la etapa de sensibilización, o durante todo el ensayo (fig. 3). A partir de los 30 minutos del reto, los ratones fueron observados individualmente durante 30 mn. Se registraron los síntomas clínicos y se cuantificaron de la manera siguiente (puntuación alérgica): 0: sin síntomas, menos de 4 episodios de rascado; 1: 4-10 episodios de rascado en torno a nariz y cabeza, sin diarrea; 2: más de 10 episodios de rascado o pelaje erizado e inmovilidad o heces blandas; 3: diarrea o respiración dificultosa o cianosis; 4: diarrea en combinación con inmovilidad tras pinchar, pelaje erizado, respiración dificultosa o cianosis; 5: anafilaxis. Cuatro horas después del reto, se sacrificaron los ratones (dislocación cervical), se recolectó sangre y el último centímetro de ileon y se congelaron en nitrógeno líquido.

MMCP-1 sérico:

Se cuantificó la proteasa-1 de mastocitos murinos (MMCP-1, por sus siglas en inglés) mediante ELISA, obtenida de Moredun Scientific (Penicuik, Escocia) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de MMCP-1 se obtuvo mediante la conversión de los valores de DO en pg/ml utilizando una curva patrón polinómica.

Aislamiento y cultivo de células de anglio linfático mesentérico:

Se homogenizaron ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) con el émbolo de una jeringa en un filtro celular (BD Facon, Milian, Meyrin Switzerland). Las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con RPMI (Sigma) complementado con suero de feto bovino (FBS, por sus siglas al inglés) al 10% (Bioconcept, París, Francia), L-glutamina al 1% (Sigma), penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma), gentamicina al 0,1% (Sigma), β -mercaptoetanol al 0,1% (Sigma). Las células se cultivaron en una placa de fondo plano de 96 pocillos (Corning, Milian) en ausencia o en presencia de OVA (1 mg/ml) con 3×10^6 células/ml. Tras 72 h, se congelaron las placas de cultivo.

Citoquinas en el sobrenadante de cultivos de GLM:

Se midió IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF- α , IL-12T de ratón utilizando el kit multiplex 9-plex de Th1/Th2 de ratón (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis de matrices de baja densidad de la expresión génica en el intestino:

Extracción y cuantificación del ARN:

Se extrajeron los ácidos ribonucleicos totales (ARN) del ileon siguiendo el protocolo del fabricante utilizando el kit del sistema de aislamiento de ARN total SV obtenido de Promega (Dübendorf, Suiza). Se cuantificó el ARN con el kit de reactivo Ribogreen quant-IT (Promega Dübendorf, Suiza) siguiendo el protocolo del fabricante.

Transcripción inversa:

Se llevó a cabo la transcripción inversa con 1 μ g de ARN total mediante la utilización del kit de transcriptasa inversa Multiscribe de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Se mezcló el ARN total con 50 μ M de hexámeros aleatorios, 0,5 mM de dNTP, 20 U de inhibidor de ARNasa (Applied Biosystems), 62,5 U de transcriptasa inversa Multiscribe, tampón IX RT y 5,5 mM de $MgCl_2$ en un volumen final de 50 μ l. Se llevó a cabo la transcripción inversa en un termociclador T3 (Biometra, Göttingen, Alemania) con el programa de ciclado siguiente: 10 min a 25°C, 30 min a 48°C, 5 min a 95°C acabando a 4°C.

Matriz de baja densidad (LDA, por sus siglas en inglés):

Se diseñaron LDA en el sitio de internet de Applied Biosystems (<http://www3.appliedbiosystems.com/index.htm>). La carga, la ejecución y los análisis se llevaron a cabo siguiendo el protocolo del fabricante en un ABI-Prism 7900HT cuantitativa.

La cuantificación se normalizó respecto a la media de los 3 genes de mantenimiento β -actina, GAPDH y HPRT. Basándose en los valores de umbral de ciclo (Ct), se determinó una expresión de ARNm relativa y normalizada para cada gen utilizando el ΔCt . El valor Ct para cada gen se corrigió con la Ct media de los tres genes de mantenimiento. Los resultados se calcularon como expresión relativa utilizando la fórmula $2^{-\Delta Ct} \times K$ en la que K es un factor 10^6 . Los resultados de factor de incremento se normalizaron respecto a los niveles de expresión en el grupo Negativo.

Ejemplo 1:

A continuación, se proporciona un ejemplo de la composición de una fórmula infantil para la utilización según la presente invención. Dicha composición se proporciona exclusivamente a título ilustrativo. La fuente de proteínas era una mezcla convencional de proteínas de suero y caseína.

ES 2 664 724 T3

Nutriente	por cada 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	670
Proteínas (g)	1,83	12,3
Grasas (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido α -linolénico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Prebiótico (100% GOS) (g)	0,64	4,3
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (μ g)	8	50
Se (μ g)	2	13
Vitamina A (μ g de ER)	105	700
Vitamina D (μ g)	1,5	10
Vitamina E (mg de ET)	0,8	5,4
Vitamina K1 (μ g)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico (μ g)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (μ g)	0,3	2
Biotina (μ g)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (μ g)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>Bifidobacterium longum</i> (NCC 2705); ver parte experimental)	2x10 ⁷ UFC/g de polvos	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de *Bifidobacterium longum* cepa NCC 2705 (CNCM-I2618) para la preparación de una composición nutricional completa para la reducción de los síntomas de alergias originadas en alimentos en pacientes con alergias inducidas por alérgenos alimentarios, en la que dicha composición proporciona una prevención secundaria significativa frente a reacciones alérgicas inducidas por dichos alérgenos alimentarios.
- 10 2. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición presenta un efecto sobre la sensibilización de dichos pacientes frente a dichos alérgenos.
- 15 3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas cepas de *Bifidobacterium longum* NCC 2705 son probióticos.
- 20 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende entre 10^5 y 10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) por cada g de composición seca.
- 25 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende por lo menos un prebiótico, preferentemente que comprende un fructooligosacárido.
- 30 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un extracto de manzana que comprende polifenoles y en la que dicho extracto de manzana ayuda a reducir los síntomas de las alergias originadas de alimentos en pacientes con alergias inducidas por alérgenos alimentarios.
- 35 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende proteínas hidrolizadas.
- 40 8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición reduce la sensibilización a otros alérgenos posteriormente en la vida.
- 45 9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos síntomas son gastrointestinales, cutáneos o respiratorios o una combinación de los mismos.
- 50 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende proteínas de cereales.
- 55 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es una fórmula infantil, unos cereales infantiles, una composición líquida para niños que comprende cereales o un alimento para lactantes.
12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es una composición de cereales para niños de 1 a 4 años de edad.
13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que se proporciona dicha composición a lactantes durante el periodo de destete y/o hasta 12 meses después.
14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos pacientes son niños pequeños de menos de seis años, preferentemente entre el nacimiento y los 3 años de edad.
15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos síntomas se ven acompañados por la liberación de mediadores bioquímicos, tales como una triptasa, quimasa, histamina o leucotrienos.
16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas cepas de *Bifidobacterium longum* NCC 2705 han sido inactivadas de manera que no sean replicantes.

Figura 1/Tabla 1. Secreción de citoquinas por CMSP humanas con predominancia de Th2 tras el cocultivo con diversas cepas de *B. longum*.

	Producción de citoquinas (% de la referencia)			
	IFN γ ^{a)}	IL-10 ^{b)}	IFN γ /IL1	IL-5 ^{c)}
<i>B. longum</i> NCC 2705	60,4	47,6	1,3	45,9
<i>B. longum</i> NCC 3001 (BB536)	63,4	13,6	4,7	81,9
<i>B. longum</i> NCC 435 (BL23)	19,1	4,3	4,4	44,8

^{a)} Cantidad de IFN γ inducida mediante estimulación con LPS de *E. coli* purificada = 100%

^{b)} Cantidad de IL-10 inducida con una cepa bacteriana de referencia con capacidad demostrada de inducir IL-10 = 100%

^{c)} Cantidad de IL-5 inducida en ausencia de ninguna estimulación (media) = 100%.

ES 2 664 724 T3

Figura 2/Tabla 2. Expresión de ARNm por CMSP humanas con predominancia de Th2 tras el cocultivo con *B. longum* NCC 2705 o *B. longum* NCC 3001 (BB536)

	Nivel de ARNm (expresión relativa) a)						
	medio		NCC 2705		NCC 3001		LPS
	10 h	24 h	10 h	24 h	10 h	24 h	24 h
IFN γ	103	119	5.406	8.529	5.719	8.363	11.917
IL-10	131	130	1.789	532	906	228	101
Tbet	860	509	1.584	1.317	1.740	1.266	1.617
IL-5	8	18	24	23	26	24	7
GATA-3	1.575	1.043	977	621	1.099	673	803

Figura 3:

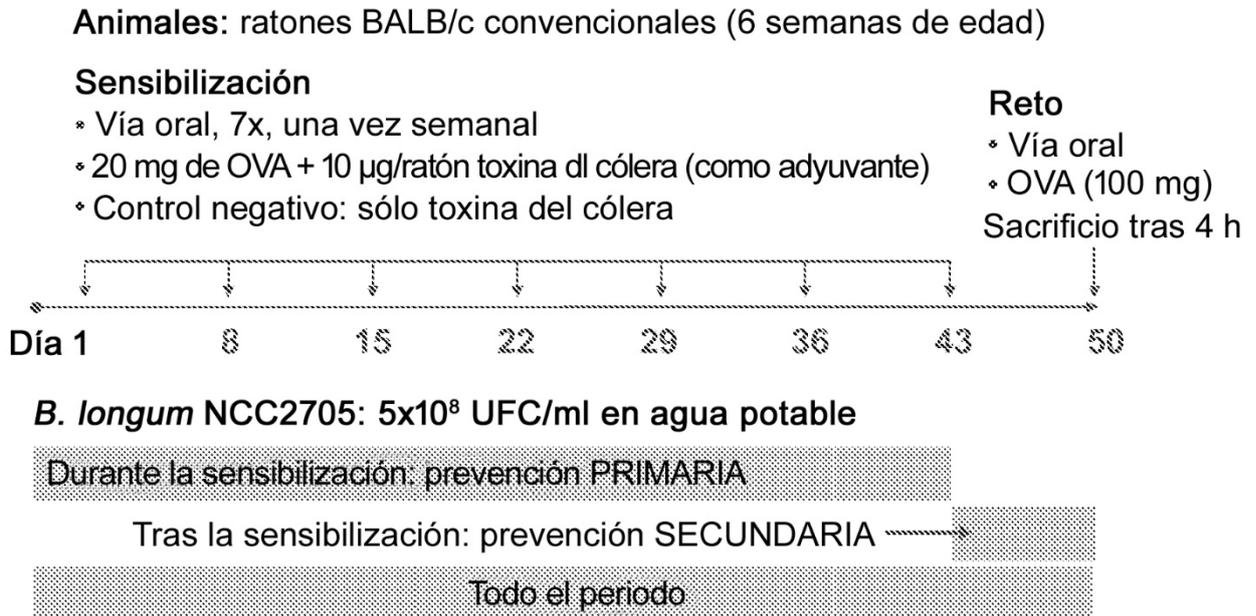


Figura 3: descripción esquemática del modelo de alergia alimentaria a OVA

Figura 5:

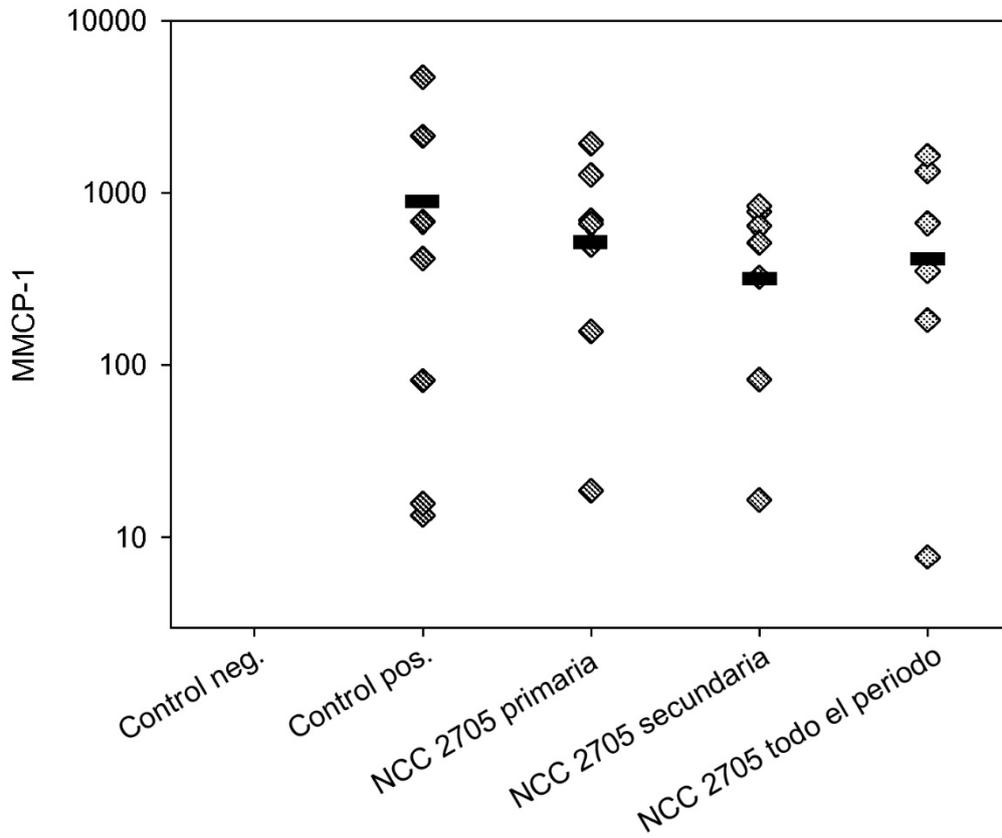


Figura 5: niveles séricos de proteasa-1 de mastocitos de ratón (MMCP-1, por sus siglas en inglés) 4 horas después del reto. Los rombos se refieren a ratones individuales; las barras indican las medianas.

Figura 6/Tabla 3. Producción de citoquinas por linfocitos LN mesentéricos estimulados nuevamente *ex vivo*

	Citoquinas (mediana en pg/ml)							
	IL-1	IL-2	IL-4	KC	TNF α	IFN γ	IL-5	IL-10
Control neg.(n=5)	17.3	1006.0	4.6	100.0	26.3	81.1	35.8	75.7
Control pos.(n=15)	35.0	2824.1	260.2	259.8	81.7	502.6	270.4	479.8
NCC 2705 primaria (n=15)	28.2	1862.7	185.2	231.8	67.9	257.5	237.6	327.1
NCC 2705 secundaria (n=14)	36.9	1689.7	279.3	227.5	47.4	488.7	345.0	460.9
NCC 2705 todo el periodo (n=15)	42.6	2180.3	260.2	320.1	63.1	914.1	216.5	483.1

Se muestran los resultados de 1 experimento representativo

Figura 7/Tabla 4: niveles de expresión génica en el fleon

Expresión génica relativa (mediana ± SEM y factor de cambio)								
	Control neg.		Control pos.		NCC 2705 primaria a)		NCC 2705 secundaria b)	
	Relativo c)	Factor d)	Relativo c)	Factor d)	Relativo	Factor	Relativo	Factor
IL-4	2±25	1	7±109	4,2	4±121	2,6	3±55	1,9
IL-5	2±26	1	68±196	35,7	9±67	4,7	24±60	12,6
IL-9	2±9	1	108±653	56,5	9±323	4,7	97±368	50,4
IL-13	2±0	1	299±221	184,6	97±142	59,8	98±154	60,4
CCR3	303±1.186	1	534±3.155	1,8	1.294±134	4,3	2.044±1.843	6,7

a) Se administró *B. longum* NCC 2705 para la prevención primaria en ratones en agua potable durante la sensibilización (días 1 a 43)
 b) Se administró *B. longum* NCC 2705 para la prevención secundaria en ratones sensibilizados en agua potable durante 1 semana antes del reto
 c) Los niveles relativos de expresión génica se normalizaron respecto a 3 genes de mantenimiento (GAPDH, β-actina y HPRT)
 d) El factor de expresión se normalizó respecto a los niveles de expresión en el grupo de control neg.