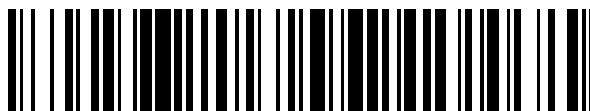


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 843**

51 Int. Cl.:

A61K 38/01 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A23K 10/18 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2013** **PCT/EP2013/050695**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013** **WO13107750**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2013** **E 13700307 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2804494**

54 Título: **Una composición que comprende cepas específicas de lactobacillus helveticus y reducción de síntomas de alergias alimentarias y/o respiratorias**

30 Prioridad:

19.01.2012 EP 12151659

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HOLVOET, SÉBASTIEN;
MERCENIER, ANNICK;
WEISS, MARIETTA y
ZUERCHER, ADRIAN WALTER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 668 843 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

Una composición que comprende cepas específicas de *Lactobacillus helveticus* y reducción de síntomas de alergias alimentarias y/o respiratorias

Campo de la invención

Esta invención se refiere al uso de probióticos, especialmente cepas de *Lactobacillus helveticus* en la fabricación de una composición para reducir los síntomas alérgicos de pacientes alérgicos cuando se exponen a alérgenos.

Antecedentes de la invención

Las alergias se encuentran entre los problemas de salud más comunes que afectan la vida de los pacientes de todas las edades. Las enfermedades alérgicas son hoy reconocidas como una epidemia por la OMS. La prevalencia de las alergias ha aumentado en las últimas décadas. El estilo de vida moderno, especialmente urbano, se ha asociado con una alta prevalencia y 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 de gran interés ya que se ha demostrado que el desarrollo de un "fenotipo alérgico" o "atopia" facilita la sensibilización posterior a otros alérgenos. Por lo tanto, las alergias en la infancia pueden ser el primer paso de una cascada alérgica que conduce a múltiples alergias más adelante en la vida, un proceso comúnmente denominado "La Marcha Atópica". Por ejemplo, se ha demostrado en cohortes humanas que los niños con hipersensibilidad alimentaria persistente a temprana edad tienen un riesgo dramáticamente mayor de desarrollar rinitis alérgica (fiebre del heno) o asma más tarde en la infancia (Ostblöm et al. Phenotypes of food hypersensitivity and development of allergic diseases during the first 8 years of life. Clin Exp Allergy. 2008 Aug;38(8): 1325-32.). Los niños con formas más leves de hipersensibilidad alimentaria también tienen un riesgo aumentado de desarrollar alergias respiratorias, pero en menor grado que los niños con hipersensibilidad alimentaria persistente. Por lo tanto, atenuar la gravedad de la hipersensibilidad alimentaria puede ser crucial para frenar la "Marcha atópica".

En este contexto, el manejo de los episodios alérgicos y la prevención de las alergias son, en la niñez y la infancia, de la mayor importancia.

El sistema inmunitario de los bebés se desarrolla activamente a lo largo de los primeros años de vida. Actuar sobre, prevenir, evitar, controlar, reducir o modular las reacciones alérgicas en pacientes tan jóvenes puede influir en su perfil alérgico a corto plazo, pero también a largo plazo para más adelante en la vida.

La prevención de las alergias se puede lograr en diferentes niveles:

La "prevención primaria" es el efecto de prevenir o reducir el riesgo de sensibilización de los pacientes a alérgenos, que se caracteriza por la ausencia o niveles reducidos de anticuerpos IgE específicos de alérgenos. La prevención o reducción de la sensibilización dará como resultado la ausencia o reducción de los síntomas alérgicos al exponerse al mismo alérgeno. Al modular la forma en que un paciente se sensibiliza con respecto a un alérgeno o un grupo de alérgenos (prevención primaria), la respuesta alérgica posterior también puede ser modulada.

La "prevención secundaria" es el efecto de modular los síntomas de las alergias, es decir, la aparición o intensidad de la reacción alérgica en un paciente ya sensibilizado a uno o varios alérgenos cuando el paciente vuelve a exponerse a dicho alérgeno o alérgenos. Al modular la aparición o intensidad de los síntomas alérgicos (prevención secundaria), se minimizan los inconvenientes y la reducción en la calidad de vida asociada con las alergias.

Dados estos conceptos distintos de prevención de la alergia, se puede formular la hipótesis de que, en virtud de sus mecanismos de acción inherentes, algunos compuestos pueden actuar únicamente en uno o en ambos de estos niveles específicos de prevención. Algunos pueden, por ejemplo, reducir únicamente la sensibilización a un alérgeno específico (prevención primaria), mientras que otros compuestos pueden tener únicamente un efecto sobre la prevención secundaria y reducir la gravedad de las reacciones alérgicas. Otros compuestos pueden influir tanto en la sensibilización como en los síntomas y, por lo tanto, son eficaces para promover la prevención primaria y secundaria.

Los alérgenos alimentarios se encuentran entre los primeros alérgenos que los bebés encuentran en su vida temprana: típicamente, los bebés que no reciben lactancia materna exclusiva pueden encontrar proteínas de leche de vaca. Las proteínas lácteas son, de hecho, una de las causas más frecuentes de alergia a los alimentos en la infancia, seguidas por los huevos y las proteínas del trigo. En general, las alergias alimentarias pueden manifestarse, en bebés y niños pequeños, por síntomas cutáneos (erupción cutánea, eczema, otros) y gastrointestinales (calambres abdominales; dolor, especialmente en el abdomen; vómitos). También pueden aparecer más sensibilizaciones y episodios de alergias cuando el bebé/niño pequeño está expuesto a un alimento nuevo como cereales, vegetales, frutas, nueces o pescado o a aeroalérgenos como polen de árboles o de hierba,

ácaros del polvo doméstico o caspa de mascotas. Adicionalmente, las reacciones alérgicas también pueden desencadenarse por alérgenos de contacto.

Sigue existiendo la necesidad de reducir específicamente las reacciones y los síntomas alérgicos en la población de niños pequeños y bebés, pero también más adelante en la vida. Esto es especialmente importante cuando se considera la maduración de los sistemas intestinal e inmune que se experimentan en los niños pequeños y cuando se considera la multiplicidad de nuevos alérgenos a los que los niños pequeños están expuestos, especialmente al momento del destete.

La pregunta de las reacciones alérgicas producidas por los alimentos a una edad temprana se complica aún más por las necesidades nutricionales específicas de los bebés y los niños pequeños.

La ingesta calórica, la densidad calórica, la variedad de nutrientes deseables, el contenido de proteínas y la calidad de las proteínas se encuentran entre los factores importantes para brindar la nutrición más adecuada a los bebés y niños pequeños. La presencia de micronutrientes como vitaminas y minerales también es importante, más específicamente cuando su concentración está limitada por intervalos recomendados específicos que corresponden a la edad de los pacientes objetivo. Como tal, para niños pequeños y bebés, las matrices de la administración de alimentos son intrínsecamente complejas pero también son menos variadas: por ejemplo, los bebés, aunque son potencialmente alérgicos, generalmente requieren un equilibrio específico de proteínas en una matriz de proteínas derivadas de la leche. La presencia de tales nutrientes múltiples puede potenciar el efecto de los alérgenos alimentarios. En matrices tan complejas, los alérgenos alimentarios de bajo registro que no pueden desencadenar la manifestación alérgica sola, pueden entonces hacerse más poderosos para iniciar una reacción alérgica, de manera similar, los compuestos que pueden neutralizar los alérgenos o actuar sobre la prevención de la alergia pueden ver su efecto disminuido o aniquilado en matrices nutricionales tan complejas. Específicamente, no es predecible si los compuestos usualmente reconocidos para actuar en la prevención de la alergia aún estarían activos, y hasta qué punto, en matrices complejas tales como la composición nutricional para bebés o niños pequeños.

Es necesario aliviar los síntomas de las alergias alimentarias o respiratorias en poblaciones de bebés y niños pequeños o adultos que tienen antecedentes de episodios alérgicos y/o que son alérgicos.

Para bebés y niños existe la necesidad de proporcionar una composición nutricional completa que no solo aporte una variedad de nutrientes sino que también reduzca la gravedad de las reacciones alérgicas. Existe la necesidad de proporcionar una composición nutricional que module la reacción alérgica de pacientes jóvenes que padecen formas de alergia leves a moderadas, ya que estos pacientes tienen necesidades especiales dictadas por la madurez incompleta de sus sistemas intestinal e inmunitario.

También existe la necesidad de modular las reacciones alérgicas en niños pequeños que no toleran moléculas farmacéuticas rigurosas, por ejemplo, mediante intervenciones nutricionales tales como la inclusión de moduladores del sistema inmune en el régimen nutricional regular.

También existe la necesidad de modular las manifestaciones de alergia respiratoria.

Existe la necesidad de proporcionar una composición nutricional que module la reacción alérgica de pacientes jóvenes en ese momento, y alrededor del momento del destete cuando el tracto intestinal se modifica sustancialmente y cuando se introducen nuevos alimentos sólidos, que potencialmente contienen nuevas proteínas alérgicas, y por consiguiente el paciente es particularmente susceptible a la sensibilización a alérgenos alimentarios.

Existe la necesidad de aliviar los síntomas de las alergias proporcionando una composición eficaz, posiblemente reduciendo la exposición a alérgenos intactos, aunque la composición puede que no reduzca directamente la sensibilización a los alérgenos. Existe la necesidad de una composición que tenga un efecto positivo en la prevención secundaria de la alergia, aunque no necesariamente actúe sobre la prevención primaria de las mismas alergias.

Finalmente, existe la necesidad de una composición, especialmente adecuada para pacientes jóvenes, que mediante la reducción de los síntomas puede ayudar a disminuir el "fenotipo alérgico" y, por lo tanto, puede reducir la sensibilización posterior en la vida a nuevos alérgenos. Hay una necesidad de atenuar la marcha atópica.

El documento WO 2010/124997 divulga el uso de las cepas CNCM I-1154 y CNCM I-1156 de *Lactobacillus helveticus* en productos lácteos acidificados con efectos de salud favorables, especialmente para niños pequeños y bebés.

El documento WO 2009/000875 divulga una cepa de *Lactobacillus helveticus* para uso en el tratamiento de la dermatitis atópica.

KAPILA SUMAN ET AL: "Immunoregulatory response of Lactobacillus helveticus fermented milk in mice", MILCHWISSENSCHAFT, vol. 63, no. 4, 2008, páginas 367-369, por ejemplo, divulga que una leche fermentada con Lactobacillus helveticus puede provocar una respuesta inmunorreguladora.

5 Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos una cepa de Lactobacillus helveticus para reducir los síntomas de alergias en pacientes que tienen alergias desencadenadas por alérgenos alimentarios, respiratorios o de contacto, en la que la cepa es Lactobacillus helveticus NCC 1176 depositada como CNCM 1-1156, Lactobacillus helveticus NCC 714 depositado como CNCM 1-1154 o una combinación de los mismos, en la que dicha composición tiene un efecto sobre la sensibilización de dichos pacientes a dichos alérgenos alimentarios, respiratorios o de contacto. La composición está especialmente diseñada para pacientes jóvenes, niños, bebés y recién nacidos. La composición puede ser una composición nutricional completa.

La composición también se puede usar para reducir los síntomas de alergias respiratorias.

Si bien la composición de la presente invención es aplicable para pacientes jóvenes, también se puede usar con éxito en pacientes adultos.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que promueve la prevención secundaria de reacciones alérgicas desencadenadas por alérgenos alimentarios, opcionalmente sin afectar la prevención primaria contra los mismos alérgenos. La presente invención proporciona una composición que comprende probióticos específicos, concretamente las cepas L. helveticus NCC 1176, y/o NCC 714.

En otro aspecto de la invención, la composición de la invención es especialmente efectiva para bebés/niños pequeños en el momento del destete.

La invención se extiende además a la reducción de la sensibilización a otros alérgenos más adelante en la vida.

30 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: perfil de secreción de citocinas de PBMC humanas con Th2 truncado después del cocultivo con L. helveticus NCC 1176, NCC 2849 o NCC 714.

Figura 2: descripción esquemática del modelo OVA de alergia alimentaria en ratón.

Figura 3: Ilustración de la puntuación clínica que muestra síntomas reducidos de alergia alimentaria en ratones que recibieron 5×10^8 CFU/ml de L. helveticus NCC 1176 en agua de beber. Los símbolos representan ratones individuales, la barra indica la mediana.

Figura 4: niveles séricos de la proteasa 1 de mastocitos de ratón (MMCP-1) en sueros 4 horas después de la exposición. Los símbolos representan ratones individuales, la barra indica la mediana.

Figura 5: representación del gráfico de puntos de IgE, IgG1, IgG2a específicas de OVA en sueros 4 horas después de la exposición medida mediante ELISA. La línea continua corresponde a la mediana.

Figura 6: producción de citocina por nódulos linfáticos (LN), linfocitos y esplenocitos mesentéricos reestimulados ex vivo.

50 Descripción detallada de la invención

Definiciones: en esta especificación, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"Composición nutricional completa". Para el propósito de este documento, una composición nutricional completa es una composición que comprende una cantidad significativa, usualmente del 50% o más, de los principales nutrientes nutricionales recomendados para una edad determinada. Dichos nutrientes principales generalmente se proporcionan en cantidad y proporción para cumplir con el 50% o más de las dosis de nutrientes recomendadas específicas para una edad determinada, cuando se usan en cantidades adecuadas para proporcionar la ingesta calórica recomendada para una edad determinada. Una composición nutricional completa usualmente comprende una fuente de proteína, una fuente de lípidos, una fuente de carbohidratos en una proporción equilibrada que cumple con la recomendación general para una determinada edad. Por lo general, también incluye micronutrientes 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 puede comprender todos los nutrientes específicos, ni todas las cantidades recomendadas, para satisfacer todas las necesidades nutricionales de un bebé o

niño pequeño. Una composición nutricional completa excluye composiciones que comprenden simplemente *Lactobacillus* en una proporción predominante.

Los "síntomas de alergias" generalmente incluyen síntomas desencadenados por alérgenos. Dichos síntomas incluyen manifestaciones cutáneas (enrojecimiento de la piel, erupción cutánea, picazón, dermatitis, eccema), oculares (picazón y ojos llorosos), gastrointestinales (congestión, dolor abdominal, calambres, vómitos, diarrea), respiratorias (picazón de la nariz, congestión nasal, rinitis, asma) y en casos severos sistémicas (mareos, confusión mental, anafilaxis).

"Prevención primaria de alergias" significa todas las medidas enfocadas a evitar o reducir la sensibilización alérgica (inmunológica), por ejemplo, prevención o reducción de anticuerpos IgE específicos de alérgenos.

"Prevención secundaria de alergias" significa la prevención o reducción del desarrollo de la enfermedad alérgica/síntomas alérgicos en un individuo sensibilizado.

El "período de destete" es el período durante el cual los bebés se adaptan de la nutrición líquida pura a alimentos sólidos o semisólidos, y se adaptan de un tipo de alimento casi único (generalmente leche materna o fórmula infantil) a una variedad de alimentos.

"Sensibilización" significa la inducción/desarrollo de anticuerpos IgE específicos para alérgenos.

"probiótico" significa preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del huésped. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. et al "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999;10 107-10). La definición de probiótico generalmente se admite y se ajusta a la definición de la OMS. El probiótico puede comprender una cepa única de microorganismo, de una mezcla de diversas cepas y/o una mezcla de diversas especies y géneros bacterianos. En el caso de las mezclas, el término singular "probiótico" todavía se puede usar para designar la mezcla o preparación probiótica.

"prebiótico" generalmente significa un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de los microorganismos presentes en el intestino del huésped, y por lo tanto intenta mejorar la salud del huésped.

La cepa *Lactobacillus helveticus* (L. helveticus) NCC 1176 (Colección de Cultivos de Nestlé referencia 1176), también se denomina LH91 y se depositó con el INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS Cedex 15 en octubre de 1991 como CNCM 1-1156.

La cepa NCC 2849 de *Lactobacillus helveticus* (L. helveticus) (Colección de Cultivos de Nestlé referencia 2849), se depositó con el INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS Cedex 15 en diciembre de 2008 como CNCM 1-4095.

La cepa NCC 714 de *Lactobacillus helveticus* (L. helveticus) (Colección de Cultivos de Nestlé referencia 714), se depositó con el INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS Cedex 15 en octubre de 1991 como CNCM 1-1154.

Los inventores han evidenciado que la reacción alérgica y los síntomas se pueden aliviar cuando se le administra L. helveticus NCC 1176 o NCC 714 a mamíferos jóvenes sensibilizados. Esta administración puede tener la forma de una composición nutricional completa que comprende L. helveticus NCC 1176 o NCC 714. Esto definió un efecto positivo en la prevención secundaria de alergias. Este efecto fue acompañado por una reducción de la sensibilización de los mamíferos jóvenes a los alérgenos (es decir, se evidenció la prevención primaria de las alergias).

En particular, este efecto no se puede generalizar sobre todas las cepas de L. helveticus, como lo demuestra L. helveticus NCC 2849, que exhibe un comportamiento completamente diferente. Por lo tanto, estos hallazgos son un ejemplo más de la especificidad de la cepa de los probióticos con respecto a los beneficios para la salud ..

Efecto de la composición:

La invención se relaciona con el uso de microorganismos del género *Lactobacillus*, más particularmente *Lactobacillus helveticus* (L. helveticus), y más específicamente las cepas L. helveticus NCC 1176 y NCC 714 en la fabricación de una composición para reducir los síntomas en pacientes que tienen alergias desencadenadas por alimentos, respiratorios y/o alérgenos de contacto. La composición puede ser una composición nutricional completa, por ejemplo. Los inventores han evidenciado que el consumo de *Lactobacillus helveticus* NCC 1176 o NCC 714 tiene un efecto particularmente pronunciado en la reducción de los síntomas de la alergia alimentaria en un grupo de ratones que reciben una composición nutricional que contiene dichas cepas de *Lactobacillus*. El modelo imita la alergia a los alimentos en humanos, cuando los humanos (típicamente bebés/niños pequeños) se sensibilizan de

forma natural a los alérgenos alimentarios y se vuelven a exponer a dichos alérgenos. Las cepas bacterianas *L. helveticus* NCC 1176 y NCC 714 muestran, por lo tanto, un efecto protector.

En una realización de la invención, el efecto de la composición es más específicamente un efecto sobre la prevención secundaria de alergias. Los síntomas de alergias, en el modelo de ratón, de hecho se reducen significativamente, como se ilustra por un puntaje clínico alérgico más bajo. En general, los síntomas pueden incluir todos o una selección de los síntomas de alergias generalmente reconocidos.

Los síntomas pueden comprender diarrea, irritación de la piel o síntomas respiratorios o combinaciones de los mismos. Los síntomas también pueden acompañarse de una liberación de mediadores bioquímicos, como triptasa, quimasa, histamina, leucotrienos.

La composición también puede tener un efecto sobre la sensibilización de los pacientes a los alérgenos. De hecho, se consigue una prevención primaria de las alergias mediante la composición que comprende *L. helveticus* NCC 1176. Los animales exhibieron una menor sensibilización a los alérgenos alimentarios. El efecto de la composición es en ese aspecto de gran interés, ya que reduce los síntomas y reduce la sensibilización, es decir, el riesgo de síntomas posteriores al volver a exponerse a los alérgenos.

La composición de la presente invención se puede usar para reducir la sensibilización a otros alérgenos más adelante en la vida. Se cree que la composición promueve (o al menos no bloquea) los procesos naturales de maduración inmune y, por lo tanto, puede tener un efecto a largo plazo sobre la disminución de la sensibilización a los mismos alérgenos o a diferentes alérgenos (reducción de la sensibilización más adelante en la vida). Al reducir los síntomas de la 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 la maduración inmune natural y tener efectos beneficiosos a largo plazo.

Composición de la invención o para uso en la invención

La composición de la invención puede ser, por ejemplo, una composición nutricional, un alimento, una bebida, un aditivo alimentario, un producto nutracéutico, un producto alimentario para mascotas, una fórmula para bebés, un cereal para bebés o un alimento para bebés.

La composición puede ser una composición nutricional completa tal como una fórmula para bebés o puede aportar una porción sustancial de la dieta completa o puede ser un complemento nutricional. Para bebés y niños, preferiblemente la composición es una composición nutricional completa que reúne todos o casi todos los requerimientos nutricionales del cuerpo objetivo cuando se toma como la única fuente de nutrientes. En otra realización, tal como un alimento para bebés, la composición aporta una porción de la dieta completa, preferiblemente más del 50% (cuantitativa y cualitativamente). En una realización, la composición comprende cereales para bebés.

Por ejemplo, si la composición está destinada al consumo por adultos, la composición puede ser un yogur o una bebida de leche fermentada.

Hasta lo que es conocido por los inventores, esta es la primera vez que se describe una cepa de *Lactobacillus helveticus* con los efectos mencionados anteriormente. Como diferentes probióticos de un género diferente o una especie diferente pueden tener efectos muy diferentes en el gusto, por ejemplo, y pueden tener diferentes requisitos para el cultivo y el almacenamiento, existe un claro deseo de tener disponible una cepa de *Lactobacillus helveticus* con los beneficios anteriores. En consecuencia, la presente invención se relaciona en particular a las cepas *L. helveticus* NCC 1176 y/o NCC 714.

La composición puede comprender entre 10^4 y 10^{11} unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de la composición seca. Cuando la composición es una fórmula para bebés, la cantidad de probiótico en la fórmula para bebés puede estar entre 10^5 y 10^8 CFU/g de fórmula para bebés. La composición puede comprender entre 10^6 y 5×10^7 CFU/g, que está en una dosis que se ha demostrado que tiene un efecto fisiológico. Se ha identificado que los probióticos a una dosis baja pueden tener un efecto beneficioso, en particular cuando la composición también comprende prebióticos y proteínas en una cantidad limitada definida. En dicha realización, los probióticos pueden estar presentes en la composición en una cantidad entre 10^3 y 10^5 CFU/g. Los prebióticos, por ejemplo en forma de oligosacáridos y/o proteínas, pueden estar presentes en una cantidad que no exceda de 4 g/100 kcal o menos de 2 g/100 kcal o menos de 1,8 g/100kcal o menos de 1,5 g/100kcal de la composición.

El probiótico se puede mezclar junto con la composición seca o húmeda de la invención. Se pueden aplicar tratamientos o procesos específicos para mejorar la estabilidad o viabilidad de los probióticos en la composición. El probiótico se puede aplicar en forma seca o en forma humectada. Después de mezclar el probiótico con la composición, la mezcla puede procesarse de manera que no afecte dramáticamente la viabilidad de los probióticos. En otra realización, los probióticos se inactivan parcialmente antes, durante o después de la mezcla. En una

realización, los probióticos se han inactivado y/o son incapaces de replicarse antes del uso en la composición de la invención. Esto, por ejemplo, puede lograrse mediante tratamiento térmico u otros tratamientos descritos.

La composición puede comprender prebióticos. Se sabe que los prebióticos comprenden carbohidratos y más específicamente, oligosacáridos. Además, se sabe que se han usado ampliamente como ingredientes alimentarios funcionales. Resisten la hidrólisis por las enzimas del tracto digestivo humano, pueden alcanzar el colon sin degradarse y proporcionan una sustancia carbohidratada particularmente adecuada para el crecimiento de bifidobacterias u 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 comercialmente disponibles tales como fructooligosacáridos contienen más de aproximadamente 95% de sólidos en forma de oligosacáridos.

Preferiblemente, una realización de la composición es una composición nutricional que comprende al menos un prebiótico.

Preferiblemente, 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 preferiblemente, el oligosacárido comprende fructooligosacárido. Más preferiblemente, el prebiótico comprende una mezcla de fructooligosacárido e inulina. Preferiblemente, esta mezcla comprende PREBIO1® o una mezcla de RAFTILOSE® y RAFTILINE® disponibles comercialmente.

Preferiblemente, el componente prebiótico de la composición puede comprender aproximadamente 50% a aproximadamente 90% de fructooligosacárido. Más preferiblemente, comprende aproximadamente 60% a aproximadamente 80% de fructooligosacárido. Más preferiblemente, comprende aproximadamente 70% de fructooligosacárido. El prebiótico puede comprender aproximadamente 10% a aproximadamente 50% de inulina, o aproximadamente 20% a aproximadamente 40% de inulina, o aproximadamente 30% de inulina. Por ejemplo, el componente prebiótico puede representar aproximadamente entre el 0,1% y el 10% de la composición.

La composición de la presente invención puede comprender además un extracto de manzana que comprende, o está enriquecido en polifenoles. El extracto de manzana ayuda, por ejemplo, a reducir los síntomas de las alergias que se originan de los alimentos en pacientes que tienen alergias desencadenadas por alérgenos alimentarios. Como tal, el extracto de manzana actúa de forma sinérgica junto con el probiótico para modular, reducir o atenuar las alergias en pacientes que padecen alergias alimentarias. Dicha composición se puede usar para alimentos para bebés y/o cereales para bebés que representan de forma natural un portador adecuado para la composición. Los alimentos para bebés o los cereales para bebés pueden contener inherentemente extractos de manzana o material de manzana.

Mecanismo hipotético de acción:

Las enfermedades alérgicas han aumentado continuamente en las últimas décadas y actualmente la OMS las considera epidemias. De una manera general, se considera que la alergia es el resultado de un desequilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 del sistema inmune que conduce a una fuerte inclinación hacia la producción de mediadores Th2. Por lo tanto, sin estar sujetos a la teoría, se formula la hipótesis de que la alergia puede mitigarse, subregularse o prevenirse restaurando un equilibrio apropiado entre los brazos Th1 y Th2 del sistema inmune. Esto implica la necesidad de reducir las respuestas Th2 o mejorar, al menos transitoriamente, las respuestas Th1. El primero podría caracterizarse por una producción reducida de citocinas Th2, como IL-5, el último podría caracterizarse por una producción aumentada de citocinas Th1, tales como IFN γ . Alternativamente, en un individuo sensibilizado, puede ser más deseable un efecto antiinflamatorio general, por ejemplo, a través de la inducción de células reguladoras T (Treg), capaces de submodular los efectos de las células Th1 y Th2. Esto podría estar indicado por la capacidad de inducir la secreción de IL-10.

La composición de la presente invención puede comprender proteínas hidrolizadas o parcialmente hidrolizadas. Una composición nutricional con base en proteínas (parcialmente) hidrolizadas es particularmente adecuada para el sistema inmune y el tracto gastrointestinal de bebés/niños pequeños porque las proteínas hidrolizadas se digieren más fácilmente y tienen una alergenidad reducida en comparación con las proteínas intactas. Además, sin estar sujeto a ninguna teoría, se puede formular la hipótesis de que las proteínas hidrolizadas podrían ser un sustrato preferible para los probióticos o bacterias intestinales (especialmente aquellas que exhiben una variedad de actividades peptidasas) en comparación con las proteínas intactas, lo que lleva a un efecto mejorado de la cepa probiótica y por consiguiente sinergismo entre proteínas hidrolizadas y probióticos. Esto representa la composición más apropiada para el sistema inmunitario y el tracto gastrointestinal de un bebé/niño pequeño con alergias alimentarias. En tal caso, la combinación de *L. helveticus* NCC 1176 y/o NCC 714 con proteínas hidrolizadas es relevante para la invención.

En una realización, las proteínas hidrolizadas son proteínas hidrolizadas a partir de suero de leche y/o caseína. Las proteínas hidrolizadas pueden ser el resultado de la acción de tripsina y/o quimotripsina sobre las proteínas (especialmente proteínas de suero). Las proteínas hidrolizadas pueden comprender proteínas de soja, proteínas de

trigo y/o proteínas de huevo. Por ejemplo, las proteínas hidrolizadas pueden ser el resultado de la acción de proteasas tal como Protamex® y/o Flavourzyme® (Novozyme, Dinamarca). Las proteínas de la composición, preferiblemente las proteínas hidrolizadas, pueden comprender proteínas de cereal o de huevo. En una realización, las proteínas hidrolizadas pueden resultar de la acción de Alcalasa. La composición de la invención puede comprender una mezcla de dos o más de las fuentes de proteína citadas.

Grupo objetivo:

La composición de la invención está más adecuadamente dirigida a pacientes relativamente jóvenes, pero las composiciones apropiadas pueden diseñarse como alimentos, bebidas o complementos nutricionales para adultos, con el mismo efecto.

Preferentemente, los pacientes son lo suficientemente jóvenes como para pasar todavía por una fase de maduración de su sistema inmune y su tracto gastrointestinal. En tales pacientes, el efecto de la composición puede ser más intenso o más rápido. En una realización, la composición es una fórmula para bebés, cereal para bebés y/o un alimento para bebés. Preferiblemente, la composición está dirigida a jóvenes humanos menores de 6 años, entre el nacimiento y la edad de 3 años o entre el nacimiento y el destete. En una realización, la composición es una fórmula para bebé inicial o de seguimiento. Preferiblemente, la composición nutricional comprende una gran mayoría de los nutrientes necesarios para la alimentación de los humanos jóvenes.

En una realización, la composición nutricional es una composición de cereal para bebés/niños pequeños de 1 a 4 años de edad. La composición puede dirigirse y administrarse más específicamente durante el período de destete y/o hasta 12 meses después. El período de destete es de hecho importante con respecto a la invención ya que los bebés están expuestos a una variedad de alimentos durante el período de destete, mientras aún experimentan maduración y reorganización de su sistema inmune y su tracto gastrointestinal. El control efectivo de la respuesta alérgica es, por lo tanto, de particular importancia durante ese período.

Con respecto al uso de la composición de la invención, los niños, bebés o recién nacidos pueden ser niños alérgicos. Los niños alérgicos son aquellos niños, bebés o recién nacidos que han experimentado al menos un episodio de reacción alérgica: leve, moderada o grave; a un alérgeno, por ejemplo, un alérgeno alimentario, respiratorio o de contacto. En una realización de la invención, los niños, bebés o recién nacidos han declarado alergias severas a alérgenos alimentarios y/o han experimentado más de un episodio moderado o grave de alergia alimentaria. Los síntomas de las alergias pueden incluir diversos síntomas conocidos, como irritación cutánea o enrojecimiento, síntomas gastrointestinales o síntomas respiratorios.

La composición de la presente invención también puede usarse para niños mayores, incluyendo adolescentes de hasta 18 años o adultos.

Los alérgenos alimentarios abarcados por la presente invención pueden incluir todos los tipos de alérgenos de origen natural o que se encuentran normalmente en alimentos, especialmente alimentos para humanos jóvenes (por ejemplo, recién nacidos, bebés, niños). Ejemplos específicos de alérgenos alimentarios típicos son leche, huevos, pescado (por ejemplo, lubina, lenguado, bacalao), mariscos de crustáceos (por ejemplo, cangrejo, langosta, camarón), nueces de árbol (por ejemplo, almendras, nuez, pacana), cacahuete, trigo, o soja.

Los alérgenos respiratorios abarcados por la presente invención pueden incluir todos los tipos de alérgenos respiratorios. Los alérgenos respiratorios típicos son, por ejemplo, ácaros del polvo, centeno, ambrosía, cucarachas, polen, moho, caspa de animales o polvo.

Los alérgenos de contacto abarcados por la presente invención pueden incluir todos los tipos de alérgenos de contacto. Los alérgenos de contacto típicos son, por ejemplo, níquel, oro, mezclas de fragancias, timerosal, sulfato de neomicina, formaldehído, cloruro de cobalto, bacitracina o Quaternium 15.

Resultados experimentales:

Los probióticos se han analizado en pruebas en humanos y en animales por su capacidad de interferir con la sensibilización alérgica o con el desarrollo de síntomas alérgicos en personas sensibilizadas. Aquí se demostró que cepas particulares de *L. helveticus*, concretamente *L. helveticus* NCC 1176 y NCC 714, tienen el potencial de mitigar el desarrollo de sensibilización o síntomas alérgicos.

Se desarrolló un sistema in vitro con base en linfocitos de sangre humana para determinar los perfiles de citocinas inducidos por diferentes cepas de *L. helveticus*. Se formuló la hipótesis que los perfiles observados son predictivos para la producción de citocina inducida in vivo por las mismas cepas y, por tanto, para los efectos biológicos conferidos por dichas cepas.

Las células de un individuo alérgico o de un individuo propenso al desarrollo de alergias se caracterizan por su propensión a producir citocinas Th2. Para imitar parcialmente este estado in vitro, se desarrolló un modelo truncado

Th2 de cultivo celular de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como alternativa al uso de PBMC de donantes alérgicos. El truncado de Th2 se indujo cultivando PBMC con interleucina (IL)-4 + anticuerpo anti-CD40 (como se detalla en Métodos); después de 3 días de cultivo para inducir el truncado de Th2, se añadieron lactobacilos durante 48 horas adicionales, dando como resultado una duración total del cultivo de 5 días. Como lectura básica, las citocinas IFN γ , IL-10 e IL-5 se midieron mediante ELISA en el sobrenadante de células estimuladas con cepas de *L. helveticus*.

La Figura 1 muestra que *L. helveticus* NCC 1176 y *L. helveticus* NCC 714 (a partir de ahora denominados NCC 1176 y NCC 714) indujeron cantidades similares de IFN- γ (101,3% y 105%) que fueron más altas que las inducidas por NCC 2849 (77,2%). NCC 1176 induce más IL-10 que NCC 714 y NCC 2849. Sin embargo, las proporciones de IFN- γ /IL-10 fueron más bajas para NCC 1176 y NCC 714 (1,4 contra 2,8) que para NCC2849. Además, NCC 1176 y NCC 714 fueron inhibidores eficientes de la secreción de IL-5. Estos datos sugieren que estas 2 cepas son productoras de IFN γ e IL-10 bajo condiciones de Th2 truncado y pueden inhibir la producción de citocinas Th2 por PBMC en contraste con la cepa NCC 2849. Por lo tanto, NCC 1176 y NCC 714 tendrán un efecto antialérgico a través de su actividad antiinflamatoria.

El efecto in vivo de *L. helveticus* NCC 1176 se probó como un ejemplo en un modelo de alergia alimentaria en ratón (Modelo de alergia alimentaria OVA en ratón, ilustrado en la figura 2).

Los ratones BALB/c se sensibilizaron a intervalos semanales con ovoalbúmina (OVA) + toxina del cólera por vía oral durante 7 semanas. En este modelo, una exposición oral con una dosis grande de OVA al final del período de sensibilización conduce a síntomas clínicos como diarrea, episodios de rascado, pelaje erizado, cianosis y pérdida de movilidad.

Se administró NCC 1176 a ratones a través de agua de beber (5×10^8 CFU/ml, ad libitum) ya sea durante la fase de sensibilización desde el día 1 al 43 (prevención primaria), durante la última semana de los experimentos (día 43-50, prevención secundaria) o a lo largo de la prueba (día 1-50, todo el tiempo).

La figura 3 muestra los síntomas clínicos. Los ratones tratados con NCC 1176 desarrollaron síntomas clínicos significativamente menos graves después de la exposición que los animales sensibilizados, no tratados (control positivo). El efecto del NCC 1176 disminuyó significativamente los síntomas clínicos cuando se administró durante la sensibilización (NCC 1176 Primaria) o después de la sensibilización (NCC 1176 Secundaria). Sin embargo, el efecto beneficioso fue más pronunciado cuando se administró NCC 1176 a lo largo de todo el experimento en el modelo animal (NCC 1176 Todo el tiempo).

Como se muestra en la figura 4, además de la puntuación clínica, se determinaron los niveles en suero de la proteasa 1 de mastocitos de ratón (MMCP-1) como una medida de la activación de los mastocitos intestinales mediante exposición al alérgeno. La exposición a OVA condujo a un fuerte aumento de los niveles séricos de MMCP-1 en el 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 ratones tratados con NCC 1176, en comparación con el grupo de control positivo.

La Figura 5 muestra que los niveles de IgE, IgG1 e IgG2a en suero específicos a OVA se incrementaron en ratones sensibilizados (Control Positivo) frente a ratones no sensibilizados (Control Negativo). El tratamiento con NCC 1176 durante la fase de sensibilización (prevención primaria o todo el tiempo) dio como resultado niveles séricos ligeramente reducidos de IgE (figura 4A), IgG1 (figura 4B) específicas a OVA, mientras que la IgG2a (figura 4C) no se vio afectada. Por el contrario, el tratamiento justo antes de la exposición (prevención secundaria) no afectó los niveles de IgE e IgG1 sérica específicos como se esperaba.

La Figura 6 muestra la producción de citocina por linfocitos reestimulados ex vivo. Para este propósito, se recolectaron linfocitos de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) después de la exposición, se reestimularon con 1 mg/ml de OVA y se cultivaron durante 72 horas. Los niveles de IL-4, IL-5, KC, IL-10, IL-12, TNF α , IFN γ , IL-1 e IL-2 se midieron por ensayo múltiple (MesoScale®). Los linfocitos MLN de ratones tratados con NCC 1176 en prevención primaria produjeron menos IL-4, IL-5, KC, TNF α , IFN γ e IL2 en comparación con el Control Positivo (Tabla 2). En ratones tratados todo el tiempo con NCC 1176, la reestimulación de MLN conduce a una disminución de IL-4, IL-5, IL-10, TNF α , IFN γ e IL-2. El perfil de citocina de ratones tratados con *L. helveticus* NCC 1176 justo antes de la exposición no difirió sustancialmente del grupo de control positivo.

Conclusión: Estos datos muestran que el consumo de *L. helveticus* NCC 1176 y/o NCC 714 conduce a síntomas reducidos (prevención primaria, secundaria) en un modelo de alergia alimentaria en ratón. Esto se puede lograr consumiendo NCC 1176 y/o NCC 714 a lo largo de la fase de sensibilización hasta el final del experimento. El efecto es más profundo cuando se consume NCC 1176 y/o NCC 714 a lo largo de todo el experimento. Sin embargo, los síntomas aún se redujeron cuando la cepa se consumió solo en la fase preventiva o en la fase de tratamiento. Esto sugiere que NCC 1176 tiene la capacidad de impactar tanto en el proceso de sensibilización como en el mecanismo efectivo que es responsable de los síntomas alérgicos. Como *L. helveticus* NCC 714 muestra las mismas características inmunes in vitro que *L. helveticus* NCC 1176, se espera que se comporte de forma similar in vivo y, por lo tanto, muestre las mismas propiedades antialérgicas, a diferencia de *L. helveticus* NCC 2849.

Métodos analíticos:Reactivos y biomasa bacteriana:

- La biomasa bacteriana se produjo por cultivo de cada cepa bajo condiciones óptimas en medio MRS. La cinética de crecimiento se determinó para cada cepa y, de acuerdo con estos, la biomasa se cosechó 3 horas después de alcanzar la fase estacionaria. En este punto temporal, los cultivos se lavaron 2x en PBS frío y se congelaron en PBS al 20% de glicerol a -80 °C en alícuotas de 50 µl. LPS (de E. coli) se adquirió en Sigma (Buchs, Suiza).

Aislamiento y cultivo de PBMC humana con Th2 truncada:

- Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de filtros obtenidos del "Centro de Transfusión del CHUV". Las células atrapadas en los filtros se llevaron de nuevo a la bolsa de recolección de sangre con 90 ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Sigma). Las células se diluyeron 1:2 con HBSS y las PBMC se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad en Histopaque 1077 (Sigma). Las células en la interfase se recolectaron y se lavaron dos veces con HBSS. Las PBMC se resuspendieron en medio de Dulbecco modificado de Iscove (cIMDM) (Sigma) complementado con suero fetal bovino FBS al 10% (Bioconcept, París, Francia), L-glutamina al 1% (Sigma), penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma) y gentamicina al 0,1 % (Sigma). Las células se cultivaron en placas de 48 pozos (Milan, Meyrin, Suiza) a $1,5 \times 10^6$ 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 citocina Th2. Se usó LPS a 1 µg/ml. Después de 3 días de cultivo, se añadieron probióticos a 10^7 , 10^6 y 10^5 CFU/ml. Después de añadir los ingredientes, se continuó el cultivo de PBMC durante 48 horas adicionales, dando como resultado una duración total en cultivo de 5 días.

ELISA de citocina:

- Se midieron IFN-γ humana, IL-5 humana, IL-10 humana, IFN-γ de ratón, IL-13 de ratón, y citocinas de IL-10 de ratón usando kits DuoSet de R&D systems de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Evaluación de los resultados de ELISA:

- Los valores de OD se transformaron en pg/ml usando las curvas estándar. Para ajustar por la gran variación de donante a donante generalmente observada con PBMC de diferentes donantes humanos, los datos se estandarizaron de acuerdo con un estándar interno arbitrario. El valor de pg/ml de IFN-γ obtenido para cada donante mediante estimulación con LPS se estableció en 100%. Para la normalización de los valores de IL-10, la cantidad de IL-10 inducida con la cepa B. lactis NCC 2818 (depositada por Nestec SA bajo CNCM-I3446) se consideró como 100%. Finalmente, la cantidad de IL-5 inducida con IL-4 y anticuerpo anti-CD40 solo en medio (es decir, en ausencia de probióticos) se estableció en 100%.

Modelo de alergia alimentaria OVA en ratón:

- Todos los estudios fueron aprobados por un Comité de Ética interno de Nestec y el Servicio Veterinario del Cantón de Vaud, Suiza (Autorización # 1970). Ratones BALB/c convencionales hembra de seis semanas (Harlan Laboratories, Francia) se sensibilizaron por vía oral (con una aguja de sonda) a intervalos semanales con 20 mg de Ovalbúmina (OVA) de Fluka (Buchs, Suiza) + 10 µg/ratón de la toxina del cólera (utilizada como adyuvante; List Biologicals, comprada de LuBioscience, Lucerne, Suiza) durante 7 semanas. Una semana después de la última sensibilización se realizó una exposición oral con 100 mg de OVA. La intervención nutricional con L. helveticus NCC 1176 (5×10^8 CFU/ml en agua de beber) se realizó en diferentes fases del experimento; para la prevención primaria durante el período de sensibilización, para la prevención secundaria que comienza al final de la fase de sensibilización, o durante toda la prueba (Figura 3). Comenzando 30 minutos después de la exposición, los ratones se observaron individualmente durante 30 minutos. Los síntomas clínicos se registraron y cuantificaron de la siguiente manera (puntaje alérgico): 0: sin síntomas, menos de 4 episodios de rascado; 1: 4-10 episodios de rascado alrededor de la nariz y la cabeza, sin diarrea; 2: más de 10 episodios rascado o pelaje erizado e inmovilidad o heces blandas; 3: diarrea o respiración trabajosa o cianosis; 4: diarrea en combinación con inmovilidad después de pinchazos, pelaje erizado, respiración trabajosa o cianosis; 5: anafilaxia. Cuatro horas después de la exposición, se sacrificaron los ratones (dislocación cervical), se tomaron sangre y el último centímetro de íleon y se congelaron en nitrógeno líquido.

MMCP-1 en suero:

- Los mastocitos murina proteasa 1 (MMCP-1) se cuantificaron en suero de ratón mediante ELISA, comprada de Moredun Scientific (Penicuik, Escocia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de MMCP-1 se obtuvo convirtiendo los valores de OD en pg/ml usando una curva estándar polinómica.

Aislamiento y cultivo de células del nódulo linfático mesentérico:

- Los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) se homogeneizaron con el émbolo de una jeringa en un colador celular (BD Falcon, Milan, Meyrin Suiza). Las células se centrifugaron y se lavaron dos veces en RPMI (Sigma)

complementado con 10% de suero fetal bovino FBS (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 placas de fondo plano de 96 pozos (Corning, Milian) en ausencia o presencia de OVA (1 mg/ml) con 3×10^6 células/ml. Después de 72 horas de cultivo, las placas se congelaron.

Citocinas en el sobrenadante de cultivos de MLN:

IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF- α , IL-12T de ratón, se midieron usando el kit 9-plex múltiplex Th1/Th2 de ratón (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1:

Un ejemplo de la composición de una fórmula para bebés para uso de acuerdo con la presente invención se proporciona a continuación. Esta composición se da a modo de ilustración solamente. La fuente de proteína es una mezcla convencional de proteína de suero y caseína.

Nutrientes	por 100kcal	por litro
Energía (kcal)	100	670
Proteína (g)	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoléico (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 RE)	105	700
Vitamina D (μ g)	1,5	10
Vitamina E (mg TE)	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

ES 2 668 843 T3

Nutrientes	por 100kcal	por litro
Vitamina B12 (µg)	0,3	2
Biotina (µg)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (µg)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>Lactobacillus helveticus</i> (NCC 1176); <i>ver parte experimental</i>)	2x10 ⁷ CFU/g de polvo	

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* para usar en la reducción de los síntomas de alergias en pacientes que tienen alergias desencadenadas por alérgenos alimentarios, respiratorios o de contacto, en la que la cepa es *Lactobacillus helveticus* NCC 1176 depositado como CNCM I-1156, *Lactobacillus helveticus* NCC 714 depositado como CNCM I-1154 o una combinación de los mismos, en el que dicha composición tiene un efecto sobre la sensibilización de dichos pacientes a dichos alérgenos alimentarios, respiratorios o de contacto.
2. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición proporciona prevención secundaria contra reacciones alérgicas desencadenadas por alérgenos alimentarios, respiratorios o de contacto.
3. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende entre 10^5 y 10^8 unidades formadoras de colonias (CFU) *Lactobacillus helveticus* por gramo de composición seca, y/o entre 10^6 y 10^{13} unidades formadoras de colonias (CFU) *Lactobacillus helveticus* por dosis diaria.
4. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende al menos un prebiótico, que comprende preferiblemente un fructooligosacárido.
5. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende un extracto de manzana que comprende polifenoles.
6. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende proteínas de cereal y/o proteínas hidrolizadas.
7. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición reduce la sensibilización a otros alérgenos más adelante en la vida.
8. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos síntomas son gastrointestinales, cutáneos o respiratorios o una combinación de los mismos.
9. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición es una composición nutricional, un alimento, una bebida, un aditivo alimentario, un nutraceutico, un producto alimenticio para mascotas, una fórmula para bebés, un cereal para bebés o un alimento para bebés.
10. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición debe administrarse a niños de 1 a 4 años.
11. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición debe administrarse a bebés durante el período de destete y/o hasta 12 meses después de eso.
12. Composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos síntomas son acompañados por liberación de mediadores bioquímicos, tales como una triptasa, quimasa, histamina, leucotrienos.

Figura 1

	Producción de citosina (% de referencia)			
	IFN γ ^{a)}	IL-10 ^{b)}	IFN γ /IL10	IL-5 ^{c)}
<i>L. helveticus</i> NCC 1176	101.3	75	1.4	39.4
<i>L. helveticus</i> NCC 2849	77.2	16	4.8	79.3
<i>L. helveticus</i> NCC 714	105.0	37.6	2.8	38.6

a) Cantidad de IFN γ inducida por estimulación con *E. coli* purificado LPS= 100%

b) Cantidad de IL-10 inducida con una cepa bacteriana de referencia con habilidad comprobada para inducir IL-10= 100%

c) Cantidad de IL-5 inducida en ausencia de cualquier estimulación (medio)= 100%.

Figura 2:

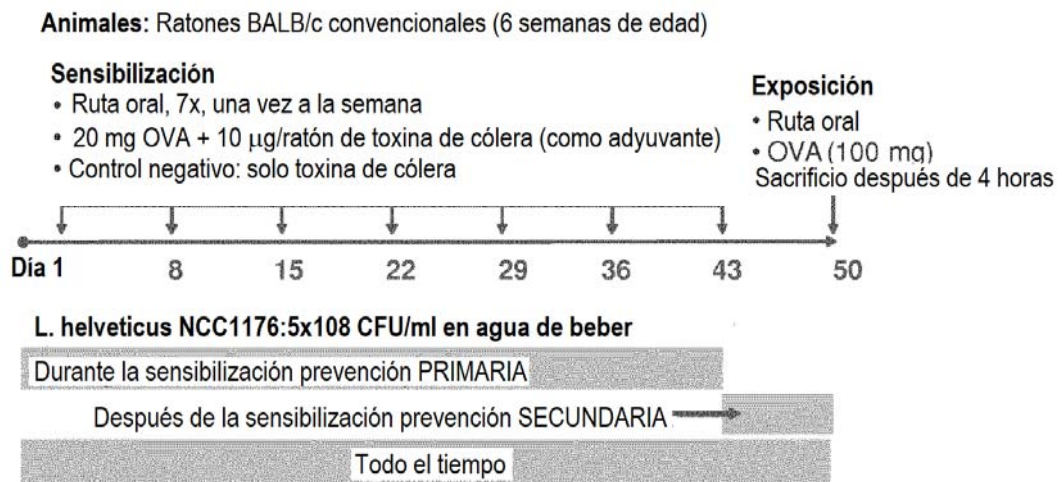


Figura 3:

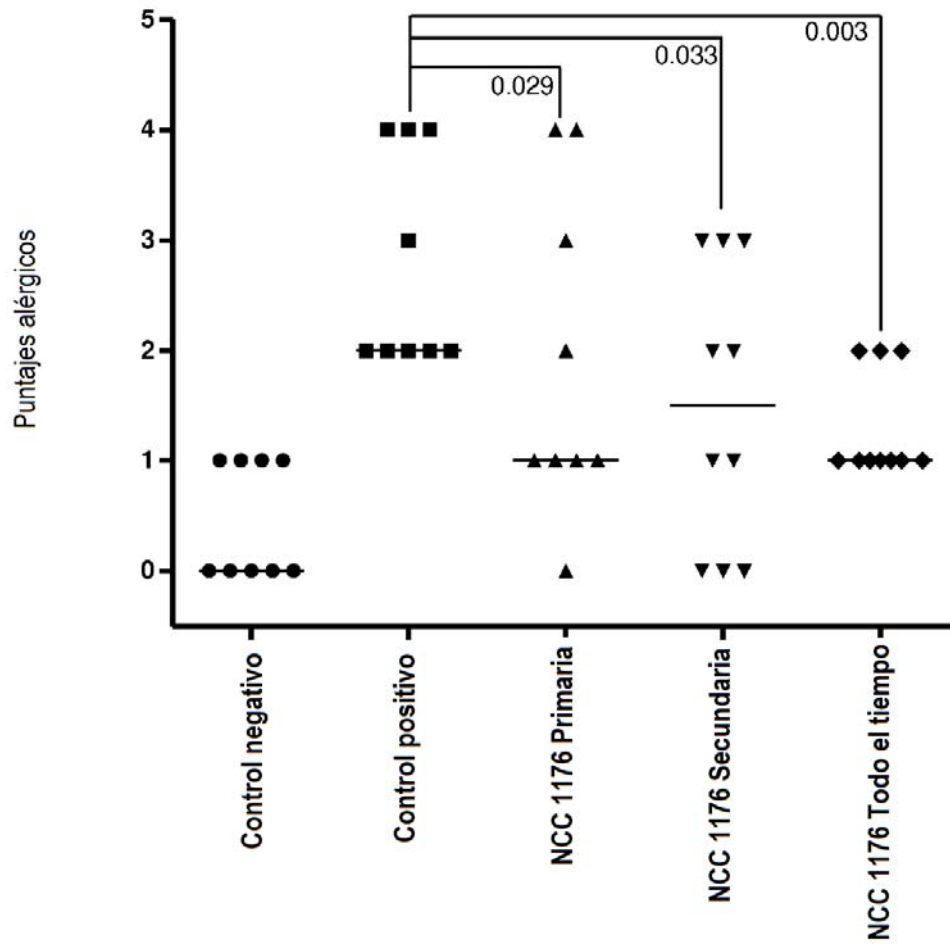


Figura 4:

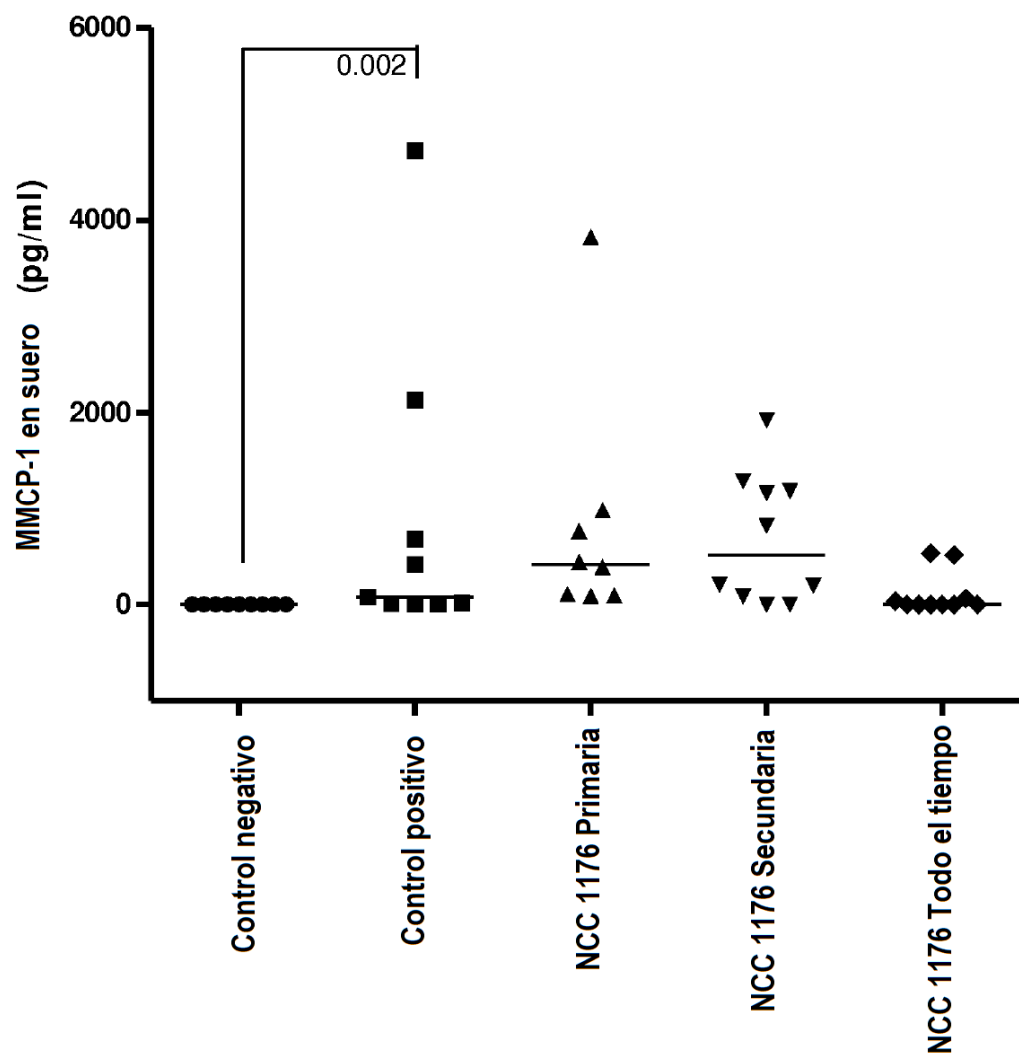


Figura 5

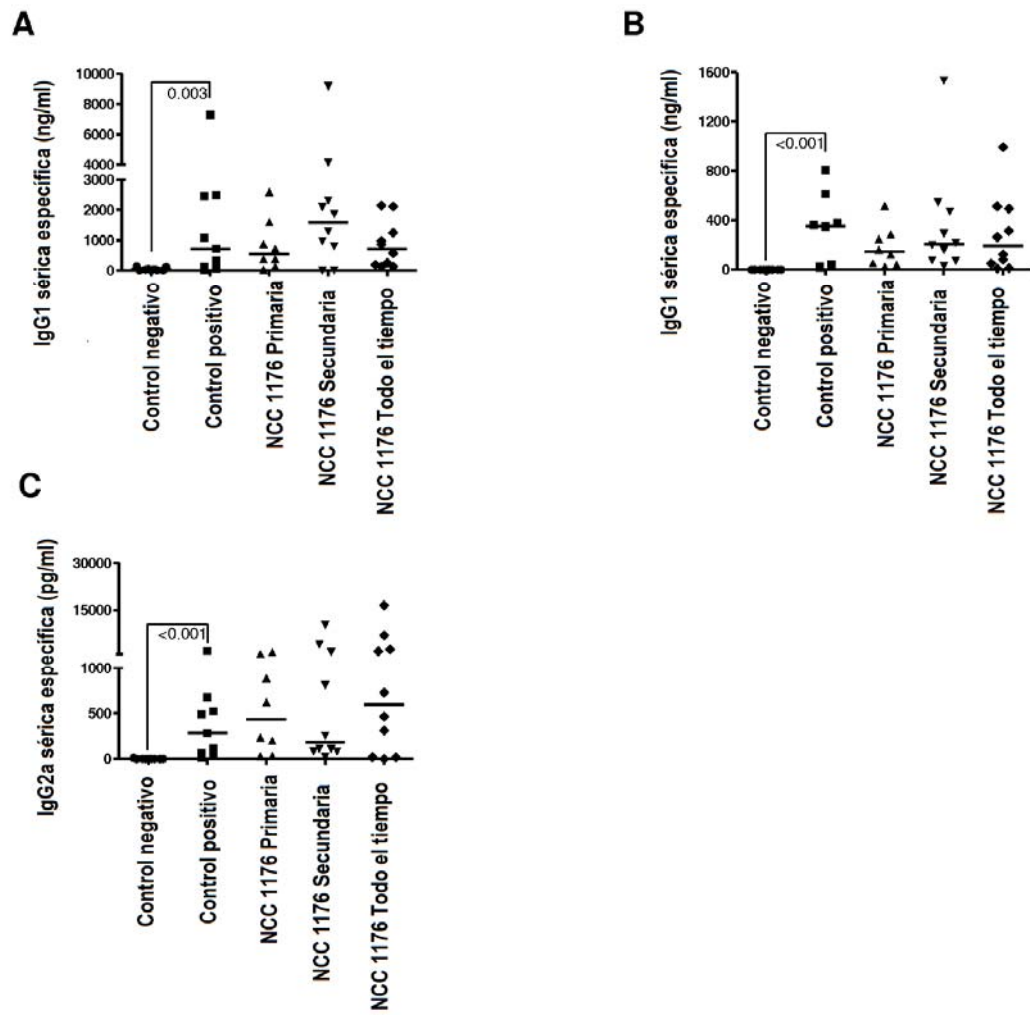


Figura 6

	Producción de citosina por MLN (mediana pg/ml $\pm$ SEM)								
	IL-4	IL-5	KC	IL-10	IL-12	TNF α	IFN γ	IL-1	IL-2
Control negativo	5 $\pm$ 0.4	16 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1	72 $\pm$ 3	523 $\pm$ 40	9 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	276 $\pm$ 19
Control positivo	61 $\pm$ 22	108 $\pm$ 69	156 $\pm$ 23	391 $\pm$ 125	672 $\pm$ 76	118 $\pm$ 20	619 $\pm$ 165	30 $\pm$ 5	677 $\pm$ 164
NCC 1176 Primaria	43 $\pm$ 7	67 $\pm$ 9	96 $\pm$ 17	355 $\pm$ 52	685 $\pm$ 72	50 $\pm$ 11	332 $\pm$ 81	26 $\pm$ 3	478 $\pm$ 53
NCC 1176 Secundaria	68 $\pm$ 22	130 $\pm$ 20	157 $\pm$ 19	402 $\pm$ 98	590 $\pm$ 61	72 $\pm$ 10	563 $\pm$ 174	28 $\pm$ 4	642 $\pm$ 126
NCC 1176 Todo el tiempo	22 $\pm$ 10	61 $\pm$ 19	124 $\pm$ 16	217 $\pm$ 45	601 $\pm$ 61	36 $\pm$ 9	140 $\pm$ 89	21 $\pm$ 3	382 $\pm$ 64