

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2011.06.17	(73) Titular(es): NESTEC S.A.	
(30) Prioridade(s): 2010.06.18 EP 10166526	AVENUE NESTLÉ 55 1800 VEVEY	CH
(43) Data de publicação do pedido: 2013.04.24	(72) Inventor(es): VALÉRIE PETIT	FR
(45) Data e BPI da concessão: 2015.09.09 234/2015	CLARA LUCIA GARCIA-RODENAS	CH
	MONIQUE JULITA	CH
	(74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO	PT
	RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA	

(54) Epígrafe: **L. JOHNSONII LA1, B. LONGUM NCC2705 E DISTÚRBIOS IMUNOLÓGICOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE, EM GERAL, AO CAMPO DE PROBIÓTICOS E, EM PARTICULAR, À PREVENÇÃO E/OU TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS E INFECCIOSOS, POR EXEMPLO, ESTIMULANDO AS DEFESAS ANTIMICROBIANAS ENDÓGENAS. UMA FORMA DE REALIZAÇÃO DA PRESENTE INVENÇÃO É UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UMA ASSOCIAÇÃO DE L. JOHNSONII (LA1, NCC 533, NÚMERO DE DEPÓSITO CNCM I-1225) E BIFIDOBACTERIUM LONGUM NCC2705 (NÚMERO DE DEPÓSITO CNCM I-2618). ESTA COMPOSIÇÃO PODE SER UTILIZADA NO TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE DISTÚRBIOS RELACIONADOS COM O SISTEMA IMUNITÁRIO INCLUINDO INFEÇÕES.

RESUMO

"*L. JOHNSONII* LA1, *B. LONGUM* NCC2705 E DISTÚRBIOS IMUNOLÓGICOS"

A presente invenção refere-se, em geral, ao campo de probióticos e, em particular, à prevenção e/ou tratamento de distúrbios inflamatórios e infecciosos, por exemplo, estimulando as defesas antimicrobianas endógenas. Uma forma de realização da presente invenção é uma composição compreendendo uma associação de *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *Bifidobacterium longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618). Esta composição pode ser utilizada no tratamento ou prevenção de distúrbios relacionados com o sistema imunitário incluindo infecções.

DESCRIÇÃO

"*L. JOHNSONII* LA1, *B. LONGUM* NCC2705 E DISTÚRBIOS IMUNOLÓGICOS"

A presente invenção refere-se, em geral, ao campo de probióticos e, em particular, à prevenção e/ou tratamento de distúrbios inflamatórios e infecciosos, por exemplo, estimulando as defesas antimicrobianas endógenas. Uma forma de realização da presente invenção é uma composição compreendendo uma combinação de *Lactobacillus johnsonii* (La1, NCC533 número de depósito CNCM I-1225) e *Bifidobacterium longum* (NCC2705 número de depósito CNCM I-2618). Esta composição pode ser utilizada no tratamento ou prevenção de distúrbios relacionados com o sistema imunitário incluindo infecções.

O nosso ambiente está contaminado por uma vasta matriz de microrganismos potencialmente patogénicos. Os queratinócitos da pele, as células epiteliais que revestem o trato gastrointestinal, trato respiratório, trato urogenital proporcionam todos uma barreira física que protege contra a intrusão microbiana no corpo.

Além disso, estes epitélios contribuem para as defesas do hospedeiro produzindo e segregando antimicrobianos que limitam o acesso de bactérias e outro microrganismos. Estas moléculas antimicrobianas constituem componentes chave da linha de defesa básica da imunidade inata.

As defensinas são uma das classes mais importantes de péptidos antimicrobianos em humanos. As defensinas são produzidas pelas células epiteliais do pulmão, pele, cavidade oral, trato urogenital, respiratório e gastrointestinal. Entre estas, há a família de β -defensinas que inclui a defensina 1 (hBD1) e 2 (hBD2).

A HBD1 é expressa em várias superfícies da mucosa, tal como a mucosa oral, glândula salivar, estômago, intestino delgado, cólon, fígado e pâncreas. A HBD2 está também presente nas células epiteliais em múltiplas superfícies da mucosa incluindo a do trato gastrointestinal. Além do mais, estas duas defensinas estão também presentes na saliva e líquido da superfície das vias aéreas (Cunliffe, R.N. e Mahida, Y.R. 2004, J Leukoc. Biol. 75:49-58).

A HBD2 está presente em níveis muito baixos nos tecidos normais, e a sua expressão é regulada positivamente por bactérias e citocinas pró-inflamatórias. Ao contrário da hBD2, a HBD1 é expressa constitutivamente. Nunca foi demonstrado que a HBD1 seja regulada positivamente, de forma consistente, por bactérias ou inflamação (Ou, G., et al., 2009, Scand. J Immunol 69:150-161).

Os probióticos são bem conhecidos como sendo capazes de reforçar as várias linhas de defesa do intestino: exclusão imunológica, eliminação imunológica e regulação imunológica. Os probióticos são também conhecidos por estimular a resistência não específica do hospedeiro a agentes patogénicos microbianos e, desse modo, ajudam à sua erradicação.

No entanto, apesar disto, a expressão da hBD1 constitutiva foi descrita como não sendo afetada por bactérias probióticas (O'Neil, D.A. et al., J Immunol 163:6718-6724) e como muito ligeiramente regulada positivamente por estirpes comensais (*Escherichia coli*) e patogénicas (*Salmonella typhimurium*) (Ou, G., et al., 2009, Scand.J Immunol 69:150-161).

Seria desejável ter disponível uma composição natural eficaz sem efeitos secundários indesejados, que pudesse ser utilizada para regular positivamente a expressão de β -defensinas, em particular da defensina 1 (hBD1) e 2 (hBD2) para estimular as defesas antimicrobianas endógenas para ser útil no tratamento ou prevenção de distúrbios relacionados com o sistema imunitário incluindo infeções.

Idealmente, a composição natural deveria conter culturas probióticas que são bem aceites na atualidade e reconhecidas pelos consumidores como proporcionando benefícios à saúde.

Os probióticos que fossem capazes de estimular a expressão de β -defensinas eficazmente, em particular da defensina 1 (hBD1) e 2 (hBD2), teriam um benefício adicional e/ou melhorado sobre a saúde, o que permitiria que os probióticos fossem particularmente eficazes, e. g., no tratamento ou prevenção de distúrbios relacionados com o sistema imunitário.

A presente requerente resolveu esta necessidade.

Deste modo, foi o objeto da presente invenção melhorar o estado da técnica e proporcionar uma composição natural e eficaz, que permite prevenir e/ou tratar distúrbios

inflamatórios e infecciosos, em particular estimulando as defesas antimicrobianas endógenas e que cumpre com os requisitos listados acima.

A requerente ficou surpreendida em observar que poderiam conseguir o objeto da presente invenção pela matéria das reivindicações independentes. As reivindicações dependentes definem adicionalmente as formas de realização preferidas da presente invenção.

A matéria da presente invenção fortalece as defesas antimicrobianas endógenas em mamíferos através da administração de um produto contendo microrganismos, tais como microrganismos não replicantes, por exemplo, microrganismos tratados termicamente.

A requerente descreu que uma combinação de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *Bifidobacterium longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) tem um efeito superior na indução da expressão de péptidos antimicrobianos.

Verificou-se, por exemplo, que uma combinação de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *Bifidobacterium longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) desencadeia eficazmente uma regulação positiva da expressão do ARNm de hBD1 e hBD2. Extraordinariamente, o efeito observado foi significativamente mais pronunciado do que poderia ter sido esperado com base nos resultados produzidos pelas duas estirpes bacterianas testadas individualmente.

Constatou-se que diferentes combinações dos dois probióticos provocavam uma regulação positiva da expressão do ARNm de hBD1 que era superior ao efeito induzido por ambas as estirpes testadas individualmente.

No que se refere à expressão de hBD2, pôde demonstrar-se que, por exemplo, a combinação dos dois probióticos com uma dose alta de *B. longum* (NCC2705, número de depósito CNCM I-2618) (90) e dose baixa de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) (10) resultava num aumento da indução de hBD2 em comparação com aquele obtido com as estirpes individuais sozinhas.

Deste modo, a requerente constatou que uma combinação de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *Bifidobacterium longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) atua sinergicamente na indução a expressão de péptidos antimicrobianos, e. g., de hBD1 e/ou hBD2.

As HBD1 e hBD2 apresentam atividade antibacteriana contra um largo espectro de bactérias incluindo *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, *H. pylori* (Nuding, S., et al., 2009, Microbes. Infect. 11:384-393) e também contra leveduras, tais como *Candida albicans* (O'Neil, D.A. 2003, Mol. Immunol 40:445-450) e vírus (vírus da imunodeficiência humana) (Kota, S. Et al., 2008, J. Biol. Chem 283:22417-22429). Assim, estes péptidos antimicrobianos podem reforçar a barreira da mucosa e, consequentemente, limitar a aderência e invasão bacteriana.

Mais e mais evidência indica que os níveis de defensinas estão reduzidos em certas condições fisiopatológicas e que este

é um fator de risco na patogénese e complicações de doenças infecciosas e inflamatórias tais como (Doss, M.et al., 2010, J Leukoc. Biol. 87:79-92; Rivas-Santiago, B.et al., 2009, Infect. Immun. 77:4690-4695):

- No aparelho respiratório:

fibrose quística, doença reativa das vias aéreas, infeções pulmonares e tabagismo, asma, pneumonia, rinite, otite, sinusite, tuberculose

- No trato gastrointestinal :

doença de Crohn (cólon e íleo), colite ulcerosa, doença celíaca, imaturidade intestinal, gastrite e úlcera gástrica induzida por infeção por *Helicobacter pylori*, diarreia infecciosa, enterocolite necrosante, diarreia associada a antibióticos.

- No aparelho urogenital :

Vaginose bacteriana, VIH, infeção urinária

- Na pele:

Dermatite atópica, úlcera crónica, carcinoma, eczema atópico, lesão por queimadura

- Na cavidade oral:

Doentes com VIH, amigdalite, gengivite, cáries dentárias

- Queratite nos olhos

Os resultados aqui apresentados indicam que uma combinação de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *Bifidobacterium longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) tem uma capacidade surpreendentemente forte para estimular a defesa antimicrobiana endógena com base na ação sinérgica e, deste modo, é mais eficiente na prevenção e tratamento de SIBO (Crescimento Excessivo Bacteriano no Intestinal Delgado), distúrbios inflamatórios e infecciosos.

Deste modo, uma forma de realização da presente invenção refere-se a uma composição compreendendo uma combinação de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618).

Pode ser utilizada qualquer proporção de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618). Todas as combinações serão mais eficazes do que as quantidades correspondentes das estirpes individuais utilizadas sozinhas.

No entanto, verificou-se que a combinação de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) é particularmente eficaz, e. g., no tratamento ou prevenção de distúrbios relacionados com o sistema imunitário, por exemplo através da estimulação da expressão de β -defensinas endógenas, se são utilizadas certas proporções específicas de *L. johnsonii* (Lal,

NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618).

Deste modo, a composição da presente invenção pode compreender *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) numa proporção na gama de cerca de 10:90 a 5:95, de um modo preferido, de cerca de 50:50 a 5:95, por exemplo, de cerca de 20:80 a 5:95.

Por exemplo, a composição da presente invenção pode compreender *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) numa proporção na gama de cerca de 10:90.

As proporções podem ser calculadas com base no número de unidades formadoras de colónias (cfu).

As composições da presente invenção podem compreender *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) numa quantidade suficiente para tratar, pelo menos parcialmente, distúrbios ligados ao sistema imunitário e/ou suas complicações. Uma quantidade adequada para conseguir isto é definida como "uma dose terapeuticamente eficaz". As quantidades eficazes para este efeito dependerão de vários fatores conhecidos dos especialistas na técnica tais como a gravidade da doença e o peso e estado de saúde geral do consumidor, e do efeito da matriz alimentar.

Nas aplicações profiláticas, as composições de acordo com a invenção são administradas a um consumidor suscetível ou, de

outro modo, em risco de distúrbios ligados ao sistema imunitário numa quantidade que é suficiente para reduzir, pelo menos parcialmente, o risco de desenvolver tais distúrbios. Uma tal quantidade é definida como sendo "uma dose eficaz profilática". Mais uma vez, as quantidades exatas dependem de vários fatores específicos do doente, tais como o estado de saúde e peso do doente, e do efeito da matriz alimentar.

Os especialistas na técnica serão capazes de ajustar de modo apropriado a dose terapeuticamente eficaz e/ou a dose profilaticamente eficaz.

Em geral a composição da presente invenção contém Lal numa dose terapeuticamente eficaz e/ou numa dose profilaticamente eficaz.

Tipicamente, a dose terapeuticamente eficaz e/ou a dose profilaticamente eficaz situa-se na gama de cerca de 0,005 mg - 1000 mg de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) por dose diária.

Em termos de quantidades numéricas, as *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) podem estar presentes na composição numa quantidade combinada correspondente a entre 10^4 e 10^{12} equivalentes de cfu/g da composição seca. Por exemplo, a composição de acordo com a presente invenção pode conter uma quantidade de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito

CNCM I-2618) correspondente a cerca de 10^4 a 10^{12} cfu por dose diária.

A composição da presente invenção pode conter cerca de 0,005 mg - 1000 mg de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) por dose diária.

A composição da presente invenção pode ser qualquer tipo de composição. A composição pode ser para ser administrada por via oral, por inalação, por via entérica, parentérica (por via subcutânea ou intramuscular), tópica ou ocular, por exemplo por via intrarretal, intravaginal.

Deste modo, a composição da presente invenção pode ser selecionada do grupo consistindo de composições alimentares, produtos alimentares incluindo alimentos para animais de estimação, bebidas, fórmulas para nutrição completa, suplementos nutritivos, nutracêuticos, aditivos alimentares, composições farmacêuticas, composições cosméticas, composições tópicas e medicamentos.

A composição da presente invenção pode ser para utilização no tratamento ou prevenção de distúrbios ligados ao sistema imunitário incluindo infeções.

De acordo com a presente invenção os distúrbios ligados ao sistema imunitário podem ser tratados ou prevenidos aumentando a expressão de β -defensinas endógenas, e. g., expressão de hBD1 e/ou hBD2.

A composição da presente invenção pode ser também para utilização no tratamento ou prevenção de distúrbios ligados a uma expressão de β -defensinas diminuída, e. g., expressão de hBD1 e/ou hBD2, tais como, por exemplo, infecções microbianas.

A presente invenção refere-se também à utilização de uma combinação de *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) na preparação de uma composição para o tratamento ou prevenção de distúrbios ligados ao sistema imunitário.

O distúrbio ligado ao sistema imunitário pode ser selecionado do grupo consistindo de infecções, em particular infecções bacterianas, virais, fúngicas e/ou parasitárias; inflamações; deficiências de fagócitos; defeito da barreira epitelial ou imaturidade do sistema imunitário, SIBO e suas combinações.

Numa forma de realização a composição da presente invenção pode ser para utilização no tratamento ou prevenção de infecções microbianas, tais como infecções virais, fúngicas e/ou parasitárias. O distúrbio ligado ao sistema imunitário pode ser também selecionado do grupo de distúrbios ligados a um nível reduzido de β -defensinas, em particular hBD1 e/ou hBD2. Tais distúrbios podem ser selecionados do grupo consistindo de fibrose quística, doença reativas das vias aéreas, infecções pulmonares do tabagismo, asma, pneumonia, rinite, otite, sinusite, tuberculose, doença de Crohn (cólon e íleo), colite ulcerosa, doença celíaca, imaturidade intestinal, defeito da barreira epitelial ou imaturidade do sistema imunitário, SIBO, gastrite e úlcera gástrica induzida por infecção por *Helicobacter*

pylori, diarreia infecciosa, enterocolite necrosante, diarreia associada a antibióticos, vaginose bacteriana, VIH, infecção urinária, dermatite atópica, úlcera crónica, carcinoma, eczema atópico, lesão por queimadura, amigdalite, gengivite, cáries dentárias, queratite nos olhos, e suas combinações.

A composição da presente invenção pode ser utilizada para estimular as defesas antimicrobianas endógenas. Isto pode ser conseguido, por exemplo, estimulando a expressão de hBD1 e/ou hBD2 endógenas.

Podem ser adicionados prebióticos. Os prebióticos podem suportar o crescimento de probióticos. Além do mais, os prebióticos podem atuar também sinergicamente com bactérias probióticas viáveis que estão presentes na composição.

As características descritas para as composições da presente invenção podem ser aplicadas às utilizações da presente invenção e vice-versa.

Outras vantagens e características da presente invenção são evidentes a partir dos seguintes Exemplos e Figuras.

A Figura 1 mostra o efeito da combinação de *B. longum* (NCC2705 número de depósito CNCM I-2618) com *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) sobre a expressão do ARNm de hBD1. As células T84 foram incubadas durante 4 h com várias misturas contendo várias concentrações de ambas as estirpes. A expressão génica de hBD1 foi analisada por PCR de tempo real. Os dados representam as médias $\pm$ epm normalizado à expressão basal de células não estimuladas.

A Figura 2 mostra o efeito da combinação de *B. longum* (NCC2705 número de depósito CNCM I-2618) com *L. johnsonii* (Lal, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) sobre a expressão de ARNm de hBD2. Células T84 foram incubadas durante 4 h com várias misturas contendo várias concentrações de estirpes vivas. A expressão génica de hBD2 foi analisada por PCR de tempo real. Os dados representam as médias $\pm$ epm normalizado à expressão basal de células não estimuladas.

Exemplos:

Protocolo experimental:

Foram utilizadas células T84 da passagem 30-40 e cultivadas em meio essencial modificado de Dulbecco/F-12 (Sigma D 6421) contendo 5% de soro fetal de vitelo (FCS) (Amined BioConcept) e glutamina 2 mM. As células foram aplicadas a uma concentração de 2×10^6 célula/poço em placas de cultura de 6 poços e cultivadas como monocamadas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ - 95% de ar. As células cultivadas até 1 semana após confluência foram incubadas com soro e meio isento de antibiótico durante, pelo menos, 12 H. Este passo foi necessário para eliminar a expressão de defensinas induzida pelo soro e prevenir qualquer influencia dos antibióticos sobre os probióticos e sobre a resposta imunológica da célula. As células foram ainda incubadas com probióticos durante 4 H. No final do tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e colhidas com o reagente de isolamento TriPure™ de acordo com o protocolo do fornecedor. A

expressão dos genes de hBD1 e hBD2 humanas nas células assim tratadas foi avaliada por PCR quantitativa.

As estirpes bacterianas utilizadas nesta experiência são *B. longum* (NCC 2705 número de depósito CNCM I-2618) e *L. johnsonii* (La1, NCC 533 número de depósito CNCM I-1225).

Resultados :

Uma vez que a *B. longum* (NCC 2705 número de depósito CNCM I-2618) e a *L. johnsonii* (La1, NCC 533 número de depósito CNCM I-1225) regulam positivamente, de forma específica a expressão do ARNm de hBD2 e hBD1 respectivamente, a requerente investigou os efeitos de uma preparação combinada destas duas estirpes nas defesas antimicrobianas intestinais. A requerente observou que as diferentes combinações dos dois probióticos provocaram uma regulação positiva da expressão do ARNm de hBD1 que foi superior ao efeito induzido por ambas as estirpes testadas individualmente (Figura 1).

No que se refere à expressão de hBD2, os dados revelaram que, por exemplo, a combinação dos dois probióticos com uma dose alta de *B. longum* (NCC2705) (90) e dose baixa de La1 (NCC533) (10) resultou num aumento da indução de hBD2 em comparação com aquela obtida com as estirpes individuais sozinhas (Figura 2).

0-1	Formulário PCT/RO/134 (SAFE) Indicações Relativas ao(s) Microrganismo(s) ou Outro Material Biológico Depositado(s) (Regra PCT 13bis)	
0-1-1	Preparado Utilizando	Apresentação em linha PCT Versão 3.5.000.221 MT/FOP20020701/0.20.5.9
0-2	Pedido Internacional N.º	
0-3	Referência do ficheiro do requerente ou agente	10962-WO-PCT
1	As indicações dadas abaixo referem- se ao(s) microrganismo(s) ou outro material biológico depositado(s) mencionado(s) na descrição na:	
1-1	página	1
1-2	linha	7
1-3	Identificação do depósito	
1-3-1	Nome da instituição depositária	CNCM Coleção nacional de culturas de microrganismos
1-3-2	Morada da instituição depositária	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, França
1-3-3	Data do depósito	30 de junho de 1992 (30.06.1992)
1-3-4	Número de Acesso	CNCM I-1225
1-5	Estados Designados para os Quais são Feitas Indicações	Todas as designações

(continuação)

2	As indicações dadas abaixo referem-se ao(s) microrganismo(s) ou outro material biológico depositado(s) mencionado(s) na descrição na::	
2-1	página	1
2-2	linha	8
2-3	Identificação do depósito	
2-3-1	Nome da instituição depositária	CNCM Coleção nacional de culturas de microrganismos
2-3-2	Morada da instituição depositária	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, França
2-3-3	Data de depósito	29 de janeiro de 2001 (29.01.2001)
2-3-4	Número de Acesso	CNCM I-2618
2-5	Estados Designados para os Quais são Feitas Indicações	Todas as designações

APENAS PARA UTILIZAÇÃO PELA AGÊNCIA RECETORA

0-4	Este formulário foi recebido com o pedido internacional: (sim ou não)	SIM
0-4-1	Funcionário autorizado	De Bruijn, john

APENAS PARA UTILIZAÇÃO PELO SECRETARIADO INTERNACIONAL

0-5	Este formulário foi recebido pelo Secretariado internacional em:	
0-5-1	Funcionário autorizado	

Lisboa, 13 de novembro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo uma combinação de *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618).
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, compreendendo *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) numa proporção na gama de 10:90 a 5:95, de um modo preferido 50:50 a 5:95, por exemplo 20:80 a 5:95.
3. Composição de acordo com uma das reivindicações anteriores, em que a composição contém uma quantidade de *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-2618) correspondente a cerca de 10^4 a 10^{12} cfu por dose diária.
4. Composição de acordo com uma das reivindicações anteriores, em que a composição contém cerca de 0,005 mg - 1000 mg de *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) e *B. longum* NCC2705 (número de depósito CNCM I-1225) por dose diária.
5. Composição de acordo com uma das reivindicações anteriores, em que a composição é selecionada do grupo consistindo de composições alimentares, produtos alimentares incluindo alimentos para animais de estimação, bebidas, fórmulas para nutrição completa, suplementos nutritivos, nutracêuticos,

aditivos alimentares, composições farmacêuticas, composições cosméticas, composições tópicas e medicamentos.

6. Composição de acordo com uma das reivindicações anteriores para utilização no tratamento ou prevenção de distúrbios relacionados com o sistema imunitário incluindo infeções.
7. Composição para utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o distúrbio relacionado com o sistema imunitário é selecionado do grupo consistindo de infeções, em particular infeções bacterianas, virais, fúngicas e/ou parasitárias; inflamações; deficiências de fagócitos; defeito da barreira epitelial ou imaturidade do sistema imunitário, SIBO e suas combinações.
8. Composição para utilização de acordo com as reivindicações 6-7, em que o distúrbio relacionado com o sistema imunitário é selecionado do grupo de distúrbios ligados a um nível reduzido de defensinas, em particular hBD1 e hBD2.
9. Composição para utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o distúrbio ligado a um nível reduzido de defensinas é selecionado do grupo que consiste de fibrose quística, doença reativa das vias aéreas, infeções pulmonares e tabagismo, asma, pneumonia, rinite, otite, sinusite, tuberculose, doença de Crohn (cólon e íleo), colite ulcerosa, doença celíaca, imaturidade intestinal, gastrite e úlcera gástrica induzida por infeção por *Helicobacter pylori*, diarreia infecciosa, enterocolite necrosante, diarreia associada a antibióticos, vaginose bacteriana,

VIH, infeção urinária, dermatite atópica, úlcera crónica, carcinoma, eczema atópico, lesão por queimadura, amigdalite, gengivite, cáries dentárias, queratite nos olhos.

10. Composição de acordo com uma das reivindicações anteriores, para utilização para estimular as defesas antimicrobianas endógenas.
11. Composição de acordo com uma das reivindicações anteriores, para utilização para estimular a expressão de hBD1 e/ou hBD2 endógenas.

Lisboa, 13 de novembro de 2015

Figura 1:

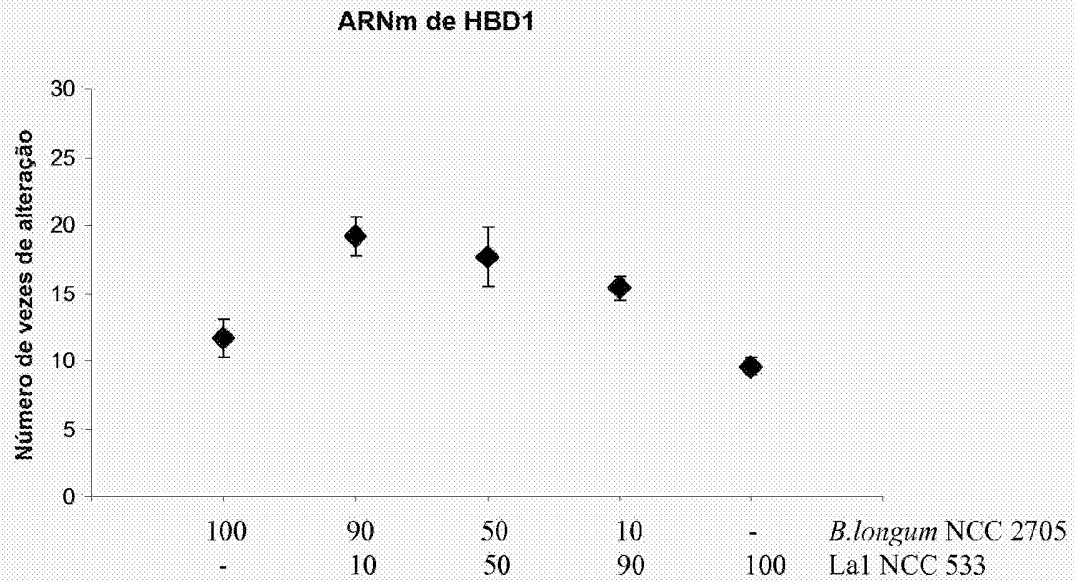


Figura 2:

