

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 232**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08730501 .7**
96 Fecha de presentación: **22.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2124977**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **Procedimiento para el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica**

30 Prioridad:
28.02.2007 US 904122 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
**MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY
2400 WEST LLOYD EXPRESSWAY
EVANSVILLE, IN 47721-0001, US**

72 Inventor/es:
**MCMAHON, Robert, J.;
RUSSELL, William Michael;
HERZ, Udo y
NEU, Josef**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 381 232 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

Procedimiento para el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica

5 REFERENCIA CRUZADA A PATENTES Y SOLICITUDES DE PATENTE RELACIONADAS

Esta solicitud es una solicitud no provisional y reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de los EE. UU. con el n° de serie 60/904.122, presentada el 28 de febrero de 2007.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

(1) Campo de la invención

15 La presente invención se refiere en general a una composición nutricional para uso en el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica.

(2) Descripción de la técnica relacionada

20 La respuesta inflamatoria es un intento del cuerpo de restablecer y mantener la homeostasis después de la invasión de un agente infeccioso, la exposición a un antígeno o un daño físico, químico o traumático. La inflamación localizada está contenida en una región específica y puede mostrar síntomas diversos que incluyen enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor.

25 Mientras que la respuesta inflamatoria se considera generalmente una respuesta sana a la lesión, el sistema inmunitario puede presentar una respuesta fisiológica no deseable si no se regula apropiadamente. En esta situación, el sistema inmunitario que normalmente protege el cuerpo causa daños a su propio tejido al tratar el tejido sano como si estuviera infectado o fuera anormal. Alternativamente, en caso de una lesión, la respuesta inflamatoria puede no guardar proporción con la amenaza que causa la lesión. Cuando eso ocurre, la respuesta inflamatoria puede causar más daño al cuerpo que el agente mismo habría producido.

30 Se ha encontrado que la respuesta inflamatoria consiste en parte en un aumento de la expresión de citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Las citocinas son proteínas biológicamente activas de bajo peso molecular implicadas en la coordinación de las respuestas inmunológica e inflamatoria y la comunicación entre poblaciones de células inmunitarias específicas. Numerosos tipos de células producen citocinas durante las reacciones inflamatorias, por ejemplo los neutrófilos, monocitos y linfocitos.

35 Existen múltiples mecanismos mediante los cuales las citocinas generadas en los sitios de inflamación afectan a la respuesta inflamatoria. Sin embargo, si una respuesta proinflamatoria no se contrarresta satisfactoriamente por citocinas antiinflamatorias, puede producirse una inflamación sistémica incontrolada.

40 En contraste con la inflamación localizada, la inflamación sistémica se extiende por todo el cuerpo. Este tipo de inflamación puede incluir una inflamación localizada en sitios específicos, pero también puede estar asociada con síntomas generales de "tipo gripe", como fiebre, escalofríos, fatiga o pérdida de energía, dolores de cabeza, pérdida del apetito y agarrotamiento muscular. La inflamación sistémica puede dar lugar a degradación de proteínas, catabolismo e hipermetabolismo. Como consecuencia, la estructura y la actividad de órganos esenciales, como los músculos, el corazón, el sistema inmunitario y el hígado pueden verse afectadas, lo que puede contribuir a una insuficiencia multiorgánica y a la mortalidad. Jeschke y col., *Insulin Attenuates the Systemic Inflammatory Response to Thermal Trauma*, Mol. Med. 8(8): 443-450 (2002). Aunque se han alcanzado enormes progresos en la comprensión de los mecanismos de la inflamación sistémica, la tasa de mortalidad debida a este trastorno sigue siendo inaceptablemente alta.

50 Con frecuencia, el que la respuesta de citocinas sea pro- o antiinflamatoria depende del equilibrio de los microorganismos individuales que colonizan el lumen intestinal en un momento determinado. Es bien sabido que la superficie mucosa del tracto intestinal está colonizada por una inmensa, compleja y dinámica colección de microorganismos. La composición de la microflora intestinal varía a lo largo del tracto intestinal así como en los diferentes microhábitats, como la capa de moco epitelial, la capa profunda de moco de las criptas y la superficie de las células epiteliales de la mucosa. La colonización específica depende de factores externos e internos que incluyen las moléculas disponibles en el lumen, la calidad del moco y las interacciones entre huésped y microorganismo y las interacciones entre microorganismos. Murch, S. H., *Toll of Allergy Reduced by Probiotics*, Lancet, 357: 1057-1059 (2001).

60 Estos microorganismos que componen la microflora intestinal están activamente implicados en la respuesta

- inmunitaria. Interaccionan con el epitelio en condiciones de relaciones de beneficio mutuo para ambos miembros (simbiosis) o en condiciones de beneficio para uno solo de los miembros sin detrimento para el otro (comensalismo). Hooper y col., *How Host-Microbial Interactions Shape the Nutrient Environment of the Mammalian Intestine*, Annu. Rev. Nutr. 22: 283-307 (2002). De hecho está apareciendo evidencia considerable que muestra una intensa interacción o "intercomunicación" entre la microflora intestinal y la diversa población de células en la mucosa intestinal. Bourlioux y col., *The Intestine and its Microflora are Partners for the Protection of the Host: Report on the Danone Symposium "The intelligent Intestine"*, París, 14 de junio de 2002, Am. J. Clin. Nutr. 78: 675 (2003); Hooper, L. V. y Gordon, J. I., *Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut*, Sci. 292: 1115 (2001); Haller y col., *Non-Pathogenic Bacteria Elicit a Differential Cytokine Response by Intestinal Epithelial Cell/Leucocyte Co-Cultures*, GUT 47: 79 (2000); Walker, W. A., *Role of Nutrients and Bacterial Colonization in the Development of Intestinal Host Defense*, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30: S2 (2000). Adicionalmente, se ha demostrado que la microflora intestinal provoca respuestas inmunitarias específicas tanto locales como sistémicas en adultos. Isolauri, E. y col., *Probiotics: Effects on Immunity*, Am. J. Clin. Nutr. 73: 444S-50S (2001).
- Se sabe que la microflora intestinal está mucho menos desarrollada en los lactantes que en un adulto. Mientras que la microflora del humano adulto consta de más de 10^{13} microorganismos y casi 500 especies, algunas de las cuales son perjudiciales y otras beneficiosas, la microflora de un lactante contiene solamente una fracción de estos microorganismos, tanto en números absolutos como en diversidad de especies. Los lactantes nacen con un intestino estéril, pero adquieren la flora intestinal de las vías del parto, su entorno inicial y de lo que ingieren. Dado que la población de la microflora intestinal es muy inestable en la vida neonatal temprana, a menudo es difícil para el intestino del lactante mantener el delicado equilibrio entre bacterias perjudiciales y beneficiosas, lo que reduce la capacidad del sistema inmunitario para funcionar con normalidad.
- Para los lactantes alimentados con fórmula es especialmente difícil mantener este equilibrio debido a las diferencias entre las especies bacterianas en el intestino de un lactante alimentado con fórmula o amamantado. Las heces de los lactantes amamantados contienen predominantemente *Bifidobacterium*, con *Streptococcus* y *Lactobacillus* presentes con menor frecuencia. En contraste, la microflora de los lactantes alimentados con fórmula es más diversa y contiene *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, así como las especies más patógenas *Staphylococcus*, *Escherichia coli* y *Clostridium*. Las diversas especies de *Bifidobacterium* en las heces de los lactantes amamantados y los lactantes alimentados con fórmula también son diferentes. Se han propuesto diversos factores como la causa de las diferencias en la flora fecal de los lactantes amamantados y de los lactantes alimentados con fórmula, que incluyen el menor contenido y la diferente composición de las proteínas en la leche humana, un menor contenido de fósforo en la leche humana, la gran variedad de oligosacáridos en la leche humana y los numerosos mediadores humorales y celulares de la actividad inmunológica en la leche materna. Agostoni y col., *Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition*. J. Pediatr. Gastro. Nutr. 38: 365-374 (abril de 2004).
- Dado que la microflora de los lactantes alimentados con fórmula es tan inestable y la microflora intestinal participa en gran medida en la estimulación de la inmunidad intestinal, los lactantes alimentados con fórmula son más propensos a padecer enfermedades inflamatorias. Muchas de las principales enfermedades que afectan a los lactantes, como la enfermedad pulmonar crónica, la leucomalacia periventricular, la meningitis neonatal, la hepatitis neonatal, la septicemia y la enterocolitis necrotizante son de naturaleza inflamatoria. Dependiendo de la enfermedad concreta, la inflamación acompañante puede tener lugar en un órgano específico, como el pulmón, el cerebro, el hígado o el intestino o la inflamación puede ser de naturaleza verdaderamente sistémica.
- Por ejemplo, la enfermedad pulmonar crónica produce inflamaciones en los tejidos en el interior de los pulmones, mientras que la meningitis neonatal implica la inflamación de los revestimientos del cerebro y la médula espinal. La leucomalacia periventricular está causada por un daño inflamatorio de la región periventricular en el cerebro en desarrollo. La enterocolitis necrotizante causa inflamación en el intestino, la cual puede resultar en la destrucción de parte o de todo el intestino y la hepatitis neonatal implica una inflamación del hígado que tiene lugar en la infancia temprana. La septicemia, también conocida como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, es una enfermedad grave causada por una infección arrolladora de la corriente sanguínea por bacterias productoras de toxinas. En esta enfermedad, los patógenos en la corriente sanguínea provocan una respuesta inflamatoria en todo el cuerpo.
- Los lactantes prematuros y gravemente enfermos también representan un importante desafío, en términos del desarrollo de la inmunidad intestinal y la prevención de la inflamación sistémica. Frecuentemente, los lactantes prematuros o gravemente enfermos se ponen inmediatamente en incubadoras estériles, donde no están expuestos a las poblaciones bacterianas a las que un lactante sano nacido a término estaría expuesto normalmente. Esto puede retrasar o perjudicar el proceso de colonización natural. Estos lactantes también se tratan a menudo con antibióticos de amplio espectro, que destruirán a las bacterias comensales que intentan colonizar el tracto intestinal del lactante. Adicionalmente, con frecuencia estos lactantes se alimentan por medio de una fórmula para lactantes, en lugar de leche materna. Cada uno de estos factores puede causar un desarrollo incorrecto de la microflora intestinal del

lactante, lo que causa o precipita la inflamación sistémica potencialmente mortal.

En los últimos años, se ha sugerido el aporte complementario de bacterias probióticas en la dieta de los lactantes alimentados con fórmula, con el fin de estimular la colonización del intestino con microorganismos beneficiosos. Las bacterias probióticas son microorganismos vivos que producen efectos beneficiosos en la salud del huésped. Fuller, R., *Probiotics in Man and Animals*, J. Appl. Bacteriol. 66: 365-78 (1989).

Mientras que las bacterias probióticas viables pueden ser eficaces en la normalización de la microflora intestinal, se han publicado muy pocos estudios que evalúen su seguridad en los lactantes prematuros e inmunodeprimidos. Estas poblaciones especiales tienen una barrera de defensa intestinal inmadura que aumenta el riesgo de translocación de las bacterias lumenales, lo que causa un aumento del riesgo potencial de infecciones. En muchos casos, no se recomienda el uso de probióticos viables para pacientes inmunodeprimidos, pacientes después de una cirugía cardíaca, pacientes con insuficiencia pancreática o pacientes con heces sanguinolentas. Se ha descrito al menos un caso de muerte debido al aporte complementario de probióticos en un individuo inmunodeprimido. MacGregor G. y col., *Yoghurt biotherapy: contraindicated in immunosuppressed patients?* Postgrad. Med. J. 78: 366-367 (2002).

Zhang Liyan y col., *Journal of Nutrition*, Wistar Institute of Anatomy and Biology, Filadelfia, PA, EE. UU., vol. 135, n° 7, págs. 1752-1758, desvelan que *Lactobacillus rhamnosus* GG tanto vivo como muerto disminuye la producción de IL-8 inducida por el factor de necrosis tumoral α en células Caco-2.

Kankaanpää Pasi y col., *Food Chemistry*, Elsevier Science Publishers Ltd, vol. 83, n° 2, págs. 269-277, desvelan que homogeneizados derivados de bacterias probióticas proporcionan señales de regulación por disminución para las células mononucleares de sangre periférica.

El documento US 2004/208863 se dirige a la actividad antiinflamatoria de las bacterias del ácido láctico.

El documento US 2006/233752 se dirige a un procedimiento para el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica en un lactante alimentado con fórmula, en que el procedimiento comprende la administración de LGG al lactante.

El documento US 2006/233762 también se dirige a un procedimiento para el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica en un lactante alimentado con fórmula, en que el procedimiento comprende la administración de LGG en combinación con al menos un LCPUFA.

Zhang Liyan y col., *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 42, n° 5, págs. 545-552 desvelan que *Lactobacillus rhamnosus* GG disminuye la inflamación sistémica inducida por lipopolisacáridos en un modelo de ratas lactantes alimentadas por gastrostomía.

Por lo tanto, sería útil proporcionar un complemento no viable que pudiera tratar o prevenir la inflamación sistémica para pacientes inmunodeprimidos o lactantes prematuros. Una alternativa no viable a los probióticos vivos puede tener beneficios adicionales como un periodo de validez más prolongado. Los probióticos vivos son sensibles al calor, la humedad y la luz y, a ser posible, deberían refrigerarse para mantener la viabilidad. Incluso con estas precauciones, el periodo de validez de un probiótico típico es relativamente corto. Una alternativa no viable a los probióticos vivos evitaría la necesidad de refrigeración y proporcionaría un producto con un periodo de validez más prolongado. El producto podría distribuirse en regiones del mundo sin fácil disponibilidad de refrigeración. Además, una alternativa no viable a los probióticos daría lugar a un menor riesgo de interacción con otros componentes alimentarios, como fermentación y cambios de sabor, textura y frescura del producto. Por consiguiente, sería beneficioso proporcionar un procedimiento para reducir o prevenir la inflamación sistémica en lactantes alimentados con fórmula que comprendiera la administración de probióticos inactivados.

RESUMEN DE LA INVENCION

Brevemente, por lo tanto, la presente invención se dirige a una composición nutricional para uso en la prevención, el tratamiento o la reducción de la inflamación sistémica en un niño o un lactante, que comprende *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado en una cantidad eficaz para proporcionar entre 1×10^4 y 1×10^{10} equivalentes de células por kg de peso corporal y día de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado.

En otras realizaciones, la invención desvela un procedimiento para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención o la reducción de la inflamación sistémica en un sujeto, caracterizado porque se usan al menos entre 1×10^4 y 1×10^{10} equivalentes de células por kg de peso corporal y día de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) inactivado como principio farmacológicamente activo.

La invención desvela además un procedimiento para reducir o prevenir la liberación sistémica de una o más citocinas o quimiocinas proinflamatorias en un sujeto, en que el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de LGG inactivado.

Además, la presente invención desvela un procedimiento para prevenir la ubiquitinación de la expresión de I κ B en un sujeto, en que el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de LGG inactivado. Además, la presente invención desvela un procedimiento para disminuir la translocación de NF κ B en un sujeto en que el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de LGG inactivado.

En un particular, la invención desvela un procedimiento para el tratamiento, la prevención o la reducción de la inflamación sistémica en un sujeto, en que el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de LGG inactivado en combinación con al menos un LCPUFA y/o al menos un probiótico viable. En realizaciones particulares, el LCPUFA puede ser ácido docosahexaenoico (DHA) o ácido araquidónico (ARA).

El objeto de la presente invención se expone en las reivindicaciones 1-12 adjuntas a este documento.

Entre las varias ventajas que se alcanzan por la presente invención está la reducción o la prevención de la inflamación sistémica. La invención puede reducir la inflamación en el hígado, el plasma, los pulmones y el intestino. Adicionalmente, la invención reduce o previene la liberación de diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias, como interleucina 1 β (IL-1 β), IL-8, CINC-1 y el oncogén relacionado con el crecimiento (GRO/KC). Dado que la presente invención puede usarse para mejorar el estado inflamatorio, también puede prevenir el inicio de infecciones o enfermedades perjudiciales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La figura 1 ilustra el efecto de LGG, vivo e inactivado, en la producción del péptido quimioatrayente de neutrófilos inducido por citocinas 1 (CINC-1) en el hígado por medio de ensayo inmunoanálisis de adsorción (ELISA). LGG inactivado se indica como "LGG tratado con calor".

La figura 2 ilustra el efecto de LGG, vivo e inactivado, en la producción del péptido quimioatrayente de neutrófilos inducido por citocinas 1 (CINC-1) en plasma por medio de ensayo inmunoanálisis de adsorción (ELISA). LGG inactivado se indica como "LGG tratado con calor".

La figura 3 ilustra el efecto de LGG, vivo e inactivado, en la producción del péptido quimioatrayente de neutrófilos inducido por citocinas 1 (CINC-1) en el pulmón por medio de ensayo inmunoanálisis de adsorción (ELISA). LGG inactivado se indica como "LGG tratado con calor".

La figura 4 ilustra el efecto de LGG, vivo e inactivado, en la producción del oncogén relacionado con el crecimiento (GRO/KC) en el hígado por medio de un ensayo multiplex de citocinas. LGG inactivado se indica como "LGG tratado con calor".

La figura 5 ilustra el efecto de LGG, vivo e inactivado, en la producción del oncogén relacionado con el crecimiento (GRO/KC) en el pulmón por medio de un ensayo multiplex de citocinas. LGG inactivado se indica como "LGG tratado con calor".

La figura 6 ilustra el efecto de LGG, vivo e inactivado, en la concentración de IL-1 β en el hígado por medio de un ensayo multiplex de citocinas. LGG inactivado se indica como "LGG tratado con calor".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones de la invención, uno o más ejemplos de las cuales se exponen a continuación. Todos los ejemplos se proporcionan con el fin de explicar la invención, no de limitarla.

En este documento se usan las siguientes abreviaturas: LGG, *Lactobacillus rhamnosus* GG; LCPUFA, ácido graso poliinsaturado de cadena larga; LPS, lipopolisacárido; IL, interleucina; CINC-1, quimioatrayente de neutrófilos inducido por citocinas 1; GRO/KC, oncogén relacionado con el crecimiento, ELISA, ensayo inmunoanálisis de

adsorción; RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; ANOVA, análisis de la varianza; DE, desviación estándar; RMS, sucedáneo de leche de rata; TLR, receptores de tipo Toll; NF-κB, factor nuclear κB; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; ARA, ácido araquidónico.

5 Los términos “probiótico inactivado” o “LGG inactivado” indican que la actividad metabólica o la capacidad reproductiva del organismo probiótico o LGG se ha reducido o destruido. Sin embargo el “probiótico inactivado” o “LGG inactivado” retiene a nivel celular al menos una porción de su estructura biológica de glicoproteínas y ADN/ARN. Según se usa en este documento, el término “inactivado” es sinónimo de “no viable”.

10 El término “probiótico” indica un microorganismo vivo, activo o viable que produce efectos beneficiosos en la salud del huésped.

El término “prebiótico” indica un ingrediente alimentario no digestible que estimula el crecimiento y/o la actividad de los probióticos.

15 Según se usa en este documento, el término “tratamiento” indica la mejora, el mejoramiento o la curación de una enfermedad, trastorno o síntoma de una enfermedad o estado.

20 El término “reducción” indica la disminución de la extensión, la cantidad o el grado.

El término “prevención” indica la detención o impedimento de una enfermedad, trastorno o síntoma de una enfermedad o estado a través de alguna acción.

25 El término “sistémico, según se usa en este documento, indica que se refiere o afecta a todo el cuerpo.

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

30 El término “prematureo” indica un lactante nacido antes de completar la 37^a semana de gestación.

El término “lactante” indica un humano menor de aproximadamente un año de edad.

35 El término “niño” indica un humano de entre aproximadamente uno y doce años de edad. En algunas realizaciones, un niño tiene una edad de entre aproximadamente uno y seis años. En otras realizaciones, un niño tiene una edad de entre aproximadamente siete y doce años.

Según se usa en este documento, el término “fórmula para lactantes” indica una composición que satisface los requerimientos nutricionales de un lactante al ser un sucedáneo de la leche humana.

40 De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto un nuevo procedimiento para el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica. El procedimiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de LGG inactivado a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un lactante.

45 Los intentos anteriores de administrar eficazmente probióticos inactivados encontraron obstáculos sustanciales. Por ejemplo, Kirjavainen, P. y col., describieron que en una comparación de LGG vivo e LGG inactivado por calor, prácticamente el 40 % de los niños que habían recibido el complemento de LGG inactivado experimentaron una grave diarrea. *Probiotic Bacteria in the Management of Atopic Disease: Underscoring the Importance of Viability*, J. Ped. Gastro. 36: 223-227 (2003). En los grupos de placebo o de LGG viable no se describieron reacciones adversas. La referencia citada, p. 225. Dado que la diarrea está asociada en gran medida con la inflamación, el estudio de Kirjavainen indica que LGG inactivado puede causar en realidad una inflamación gastrointestinal. De hecho, el estudio señala que el proceso de inactivación térmica puede causar la desnaturalización de los péptidos de superficie y la expresión de la proteína de choque térmico, lo que modifica las propiedades de inmunostimulación de LGG de tal manera que la forma inactivada por calor induciría respuestas inflamatorias y en consecuencia

50 aumentaría la permeabilidad intestinal. La referencia citada, p. 226. En contraste, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento nuevo para el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica a través de la administración de LGG inactivado.

60 LGG es una cepa probiótica aislada de la flora intestinal humana sana. Se desveló en la patente de los EE. UU. n° 5.032.399 de Gorbach y col. LGG es resistente a la mayoría de los antibióticos, estable en presencia de ácido y bilis y se une con avidéz a las células de la mucosa del tracto intestinal humano. Sobrevive durante uno a tres días en la mayor parte de los individuos y hasta siete días en el 30 % de los sujetos. Además de su capacidad colonizadora, LGG también tiene un efecto beneficioso sobre las respuestas inmunitarias de la mucosa. La cepa LGG está

depositada en la Colección americana de cultivos tipo, con el número de acceso ATCC 53103.

En la presente invención se usa LGG que ha sido inactivado. La inactivación puede tener lugar por cualquier procedimiento conocido actualmente en la técnica o aún por desarrollar. La inactivación puede realizarse, por ejemplo, por medio de un tratamiento térmico, liofilización, luz ultravioleta, radiación gamma, presión, disrupción química o disrupción mecánica. Por ejemplo, LGG puede inactivarse por tratamiento térmico por medio del almacenamiento a temperaturas entre 80 °C y 100 °C durante 10 minutos. LGG también pueden inactivarse con luz ultravioleta por medio de la irradiación durante 5 minutos a una distancia de 5 cm con una lámpara de UVC de 30 W. Alternativamente, LGG puede inactivarse mediante radiación gamma por medio de la irradiación con 2 kGy con una fuente de cobalto 60 a una distancia de 20 cm.

De acuerdo con la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de LGG inactivado es una cantidad suficiente para reducir o prevenir la inflamación sistémica en un sujeto. Esta cantidad puede corresponder a entre 1×10^4 y 1×10^{12} equivalentes de células por kg de peso corporal y día. En otra realización, la presente invención comprende la administración de entre 1×10^6 y 1×10^9 equivalentes de células por kg de peso corporal y día. En otro experimento más pueden administrarse 1×10^8 equivalentes de células por kg de peso corporal y día.

De acuerdo con la presente invención, el sujeto tiene necesidad de tratamiento, reducción o prevención de la inflamación sistémica. El sujeto puede presentar riesgo de inflamación sistémica debido a una predisposición genética, la dieta, el estilo de vida, enfermedades, trastornos y similares. Por ejemplo, un lactante prematuro o inmunodeprimido puede presentar riesgo de inflamación sistémica y, por lo tanto, puede tener necesidad de tal tratamiento, reducción o prevención.

Por lo tanto, LGG inactivado puede administrarse a un lactante o a un niño para prevenir, tratar o reducir la inflamación sistémica. En una realización, el lactante puede tener menos de un año de edad. En otra realización, el niño puede tener una edad de entre uno y seis años. En otra realización más, el niño puede tener una edad de entre siete y doce años.

La forma de administración de LGG inactivado en el procedimiento de la invención no es importante, siempre que se administre la cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, LGG inactivado se administra a un sujeto por medio de comprimidos, píldoras, encapsulados, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina, cápsulas, gotas de aceite o sobrecitos. En esta realización del procedimiento, un complemento de LGG inactivado puede ingerirse en combinación con otros complementos nutricionales, como vitaminas, o en combinación con un complemento de LCPUFA, como DHA o ARA.

En otra realización, LGG inactivado se encapsula en un azúcar, una grasa o un polisacárido. En otra realización más, LGG se añade a un producto alimenticio o una bebida y se consume. El producto alimenticio o la bebida pueden ser productos nutricionales para niños como fórmula de continuación, leche de crecimiento, bebidas, leche, yogur, zumos de frutas, bebidas a base de frutas, comprimidos masticables, galletas, galletas saladas o leche en polvo o el producto puede ser un producto nutricional para lactantes, como una fórmula para lactantes.

En una realización, la fórmula para lactantes para uso en la presente invención es completa desde el punto de vista nutricional y contiene los tipos y cantidades adecuados de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. La cantidad de lípidos o de grasas puede variar típicamente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 7 g/100 kcal. La cantidad de proteínas puede variar típicamente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 g/100 kcal. La cantidad de carbohidratos puede variar típicamente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 12 g/100 kcal. Las fuentes de proteínas pueden ser cualquiera de las usadas en la técnica, p. ej. leche desnatada, proteína de suero, caseína, proteína de soja, proteína hidrolizada, aminoácidos y similares. Las fuentes de carbohidratos pueden ser cualquiera de las usadas en la técnica, p. ej. lactosa, glucosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón, sólidos de jarabe de arroz y similares. Las fuentes de lípidos pueden ser cualquiera de las usadas en la técnica, p. ej. aceites vegetales como aceite de palma, aceite de soja, palmoleína, aceite de coco, aceites triglicéridos de cadena media, aceite de girasol rico en ácido oleico, aceite de cártamo rico en ácido oleico y similares.

Convenientemente, puede usarse fórmula para lactantes disponible en el comercio. Por ejemplo, Enfamil®, Enfamil® para prematuros, Enfamil® con hierro, Lactofree®, Nutramigen®, Pregestimil® y ProSobee® (disponibles de Mead Johnson & Company, Evansville, IN, EE. UU.) pueden complementarse con concentraciones adecuadas de LGG inactivado y usarse en la práctica del procedimiento de la invención.

En una realización de la invención, LGG inactivado puede combinarse con uno o más probióticos viables y/o inactivados para el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica en lactantes alimentados con fórmula. Cualquier probiótico vivo o inactivado conocido en la técnica puede ser aceptable en esta realización, siempre que

consiga el resultado deseado. En una realización particular, el probiótico viable y/o inactivo se elige del grupo que consta de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

5 Si un probiótico vivo se administra en combinación con el probiótico inactivado, la cantidad del probiótico vivo puede corresponder a entre aproximadamente 1×10^4 y 1×10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc) por kg de peso corporal y día. En otra realización, los probióticos vivos pueden comprender entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^9 ufc por kg de peso corporal y día. En otra realización más, los probióticos vivos pueden comprender aproximadamente 1×10^8 ufc por kg de peso corporal y día.

10 En otra realización de la invención, LGG inactivado puede combinarse con uno o más prebióticos para el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica en lactantes alimentados con fórmula. En esta realización será aceptable cualquier prebiótico conocido en la técnica, siempre que consiga el resultado deseado. Los prebióticos de la presente invención pueden incluir lactulosa, galactooligosacárido, fructooligosacárido, isomaltooligosacárido, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, xilooligosacárido y gentiooligosacáridos.

15 En otra realización más de la presente invención, la fórmula para lactantes puede contener otros agentes activos como ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA). Los LCPUFA adecuados incluyen, pero no se limitan a ácido α -linoleico, ácido γ -linoleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosapentaenoico (EPA), ARA y DHA. En una realización LGG inactivado se administra en combinación con DHA. En otra realización, LGG inactivado se administra en combinación con ARA. En otra realización más, LGG inactivado se administra en combinación con ambos DHA y ARA. Una fórmula para lactantes disponible comercialmente que contiene DHA, ARA o una combinación de estos puede complementarse con LGG inactivado y usarse en la presente invención. Por ejemplo, Enfamil® LIPIL®, que contiene concentraciones eficaces de DHA y ARA, está disponible comercialmente y puede complementarse con LGG inactivado y utilizarse en la presente invención.

20 En una realización, se usan tanto DHA como ARA en combinación con LGG inactivado para el tratamiento de la inflamación sistémica en lactantes. En esta realización, típicamente, la razón ponderal ARA:DHA es de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 9:1. En una realización de la presente invención, esta razón es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 4:1. En otra realización más, esta razón es de aproximadamente 2:3 a aproximadamente 2:1. En una realización particular, la razón es de aproximadamente 2:1. En otra realización particular de la invención, la razón es de aproximadamente 1:1,5. En otras realizaciones, la razón es de aproximadamente 1:1,3. En otras realizaciones más, la razón es de aproximadamente 1:1,9. En una realización particular, la razón es de aproximadamente 1,5:1. En otra realización más, la razón es de aproximadamente 1,47:1.

35 En ciertas realizaciones de la invención, la concentración de DHA es de entre aproximadamente el 0,0 % y el 1,00 % en peso de los ácidos grasos.

40 La concentración de DHA puede ser de aproximadamente el 0,32 % en peso. En algunas realizaciones, la concentración de DHA puede ser de aproximadamente el 0,33 % en peso. En otra realización, la concentración de DHA puede ser de aproximadamente el 0,64 % en peso. En otra realización, la concentración de DHA puede ser de aproximadamente el 0,67 % en peso. En otra realización más, la concentración de DHA puede ser de aproximadamente el 0,96 % en peso. En otra realización, la concentración de DHA puede ser de aproximadamente el 1,00 % en peso.

45 En algunas realizaciones de la invención, la concentración de ARA es de entre el 0,0 % y el 0,67 % en peso de los ácidos grasos. En otra realización, la concentración de ARA puede ser de aproximadamente el 0,67 % en peso. En otra realización, la concentración de ARA puede ser de aproximadamente el 0,5 % en peso. En otra realización más, la concentración de DHA puede ser de entre aproximadamente el 0,47 % y el 0,48 % en peso.

50 Típicamente, la cantidad eficaz de DHA en una realización de la presente invención es de aproximadamente 3 mg por kg de peso corporal y día a aproximadamente 150 mg por kg de peso corporal y día. En una realización de la invención, la cantidad es de aproximadamente 6 mg por kg de peso corporal y día a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal y día. En otra realización, la cantidad es de aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal y día a aproximadamente 60 mg por kg de peso corporal y día. En otra realización más, la cantidad es de aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal y día a aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal y día.

55 Típicamente, la cantidad eficaz de ARA en una realización de la presente invención es de aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal y día a aproximadamente 150 mg por kg de peso corporal y día. En una realización de esta invención, la cantidad varía de aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal y día a aproximadamente 120 mg por kg de peso corporal y día. En otra realización, la cantidad varía de aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal y día a aproximadamente 90 mg por kg de peso corporal y día. En otra realización más, la cantidad varía de aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal y día a aproximadamente 60 mg por kg de peso corporal y día.

Típicamente, la cantidad de DHA en fórmulas para lactantes para uso en la presente invención varía de aproximadamente 5 mg/100 kcal a aproximadamente 80 mg/100 kcal. En una realización de la presente invención, DHA varía de aproximadamente 10 mg/100 kcal a aproximadamente 50 mg/100 kcal, y en otra realización, de aproximadamente 15 mg/100 kcal a aproximadamente 20 mg/100 kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de DHA es de aproximadamente 17 mg/100 kcal.

Típicamente, la cantidad de ARA en fórmulas para lactantes para uso en la presente invención varía de aproximadamente 10 mg/100 kcal a aproximadamente 100 mg/100 kcal. En una realización de la presente invención, la cantidad de ARA varía de aproximadamente 15 mg/100 kcal a aproximadamente 70 mg/100 kcal. En otra realización, la cantidad de ARA varía de aproximadamente 20 mg/100 kcal a aproximadamente 40 mg/100 kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de ARA es de aproximadamente 34 mg/100 kcal.

La fórmula para lactantes complementada con aceites que contienen DHA y ARA para uso en la presente invención puede prepararse mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden añadirse a la fórmula en sustitución de una cantidad equivalente de un aceite, por ejemplo, aceite de girasol rico en ácido oleico, presente normalmente en la fórmula. Como otro ejemplo, los aceites que contienen DHA y ARA pueden añadirse a la fórmula en sustitución de una cantidad equivalente al resto de la mezcla de grasa global presente normalmente en la fórmula, sin DHA ni ARA.

La fuente de DHA y ARA puede ser cualquier fuente conocida en la técnica, como aceite marino, aceite de pescado, aceite de organismos unicelulares, lípidos de yema de huevo, lípidos cerebrales y similares. DHA y ARA pueden estar en una forma natural, siempre que el resto de la fuente de LCPUFA no resulte en un efecto perjudicial para el lactante. Alternativamente, DHA y ARA pueden usarse en forma refinada.

En una realización de la presente invención, las fuentes de DHA y ARA son aceites de organismos unicelulares como se describen en las patentes de los EE. UU. n° 5.374.567, n° 5.550.156 y n° 5.397.591. Sin embargo, la presente invención no se limita solo a estos aceites.

En una realización, la fuente de LCPUFA contiene EPA. En otra realización, la fuente de LCPUFA sustancialmente no contiene EPA. Por ejemplo, en una realización de la presente invención la fórmula para lactantes contiene menos de aproximadamente 16 mg de EPA/100 kcal; en otra realización, menos de 10 mg de EPA/100 kcal y aún en otra realización menos de 5 mg de EPA/100 kcal. Una realización particular sustancialmente no contiene EPA. Otra realización no contiene EPA, de modo que carece incluso de trazas de EPA.

Se cree que la combinación de LGG inactivado con DHA y/o ARA proporciona efectos complementarios o sinérgicos con respecto a las propiedades antiinflamatorias de las formulaciones que contienen estos agentes. Sin querer limitarse a ninguna teoría, se cree que LGG inactivado confiere efectos antiinflamatorios, en parte al prevenir la ubiquitinación del inhibidor de κ B ($\text{I}\kappa\text{B}$). En una célula normal, $\text{I}\kappa\text{B}$ se une al factor nuclear κ B (NF κ B) dentro del citoplasma. Cuando se produce la ubiquitinación de $\text{I}\kappa\text{B}$, NF κ B se libera, penetra en el núcleo de la célula y activa genes que son responsables de la respuesta inflamatoria. Es esta interacción específica y la alteración de la expresión génica resultante lo que se piensa que está implicado en la modulación de la inflamación. Se cree que LGG inactivado previene la ubiquitinación de $\text{I}\kappa\text{B}$, lo que a su vez previene la liberación de NF κ B y reduce o previene la inflamación.

En contraste, se piensa que los ácidos grasos ω -3 como DHA confieren un efecto antiinflamatorio a través de la alteración de la producción de los mediadores proinflamatorios derivados de ácidos grasos conocidos ampliamente como eicosanoides. Los ácidos grasos ω -6 como ARA, que están incluidos en la reserva de fosfolípidos de las membranas celulares, se liberan durante la respuesta inflamatoria y liberan una reserva de ARA libre. Sobre esta reserva de ARA actúan entonces dos clases de enzimas, conocidas como lipooxigenasas y ciclooxigenasas, que producen una gama específica de eicosanoides que incluyen los prostanooides de la serie 2, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

Se sabe que estos eicosanoides tienen numerosos efectos proinflamatorios en muchos tipos celulares y órganos. Se sabe que las dietas ricas en ácidos grasos ω -3, como EPA y DHA, compiten con los ácidos grasos ω -6 en varias etapas de este proceso y, por lo tanto, moderan los efectos proinflamatorios de ARA. Por ejemplo, los ácidos grasos ω -3 modulan la elongación de los ácidos grasos ω -6 para dar ARA, la incorporación de ARA en la reserva de fosfolípidos de la membrana celular y la producción de eicosanoides proinflamatorios a partir de ARA. Por consiguiente, la combinación de DHA y ARA proporciona efectos distintos pero complementarios para la moderación de la respuesta inflamatoria en múltiples tejidos.

Además, en algunas realizaciones de la invención se administran LGG vivo y LGG inactivado combinados entre sí.

Se cree que la combinación de LGG vivo e inactivado proporciona efectos complementarios o sinérgicos con respecto a las propiedades antiinflamatorias de las formulaciones que contienen estos agentes. Sin querer limitarse a ninguna teoría, se piensa que los probióticos vivos como LGG confieren efectos antiinflamatorios en parte debido a la interacción con receptores específicos conocidos como los receptores de tipo Toll (TLR) en la superficie de células inmunitarias específicas. La interacción directa o indirecta entre LGG vivo y estos receptores inicia una cascada intracelular de transducción de señales que resulta en la alteración de la expresión génica en estas células diana. Es esta interacción específica y la alteración resultante de la expresión génica y otros efectos celulares lo que se cree que está implicado en la modulación de la inflamación. Por lo tanto, dado que se cree que LGG vivo y LGG inactivado actúan a través de mecanismos diferentes, se piensa que la combinación de estos componentes proporciona efectos antiinflamatorios complementarios o sinérgicos.

Además, en algunas realizaciones de la invención se administra LGG vivo, LGG inactivado y al menos un LCPUFA combinados entre sí. Dado que se cree que LGG vivo, LGG inactivado y LCPUFA actúan respectivamente a través de mecanismos diferentes, se cree que la combinación de estos componentes proporciona efectos complementarios o sinérgicos con respecto a las propiedades antiinflamatorias de las formulaciones que contienen estos agentes.

En una realización de la presente invención, el sujeto es un lactante alimentado con fórmula. En una realización el lactante se alimenta con fórmula desde su nacimiento. En otra realización, el lactante se amamanta desde el nacimiento hasta una edad inferior al año y se alimenta con fórmula a partir de entonces, comenzando en este momento el aporte complementario de LGG inactivado.

En una realización particular de la presente invención, el procedimiento comprende el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica en un lactante prematuro alimentado con fórmula. En este procedimiento, LGG inactivado puede administrarse al lactante prematuro en forma de una fórmula para lactantes o en cualquier otra forma adecuada. Además, si se desea, LGG inactivado al lactante prematuro puede administrarse en combinación con DHA, ARA y/o más probióticos vivos para crear un efecto antiinflamatorio potencialmente sinérgico.

En un procedimiento de la presente invención, LGG inactivado reduce o previene la liberación sistémica de una o más citocinas o quimiocinas proinflamatorias. Según se usa en este documento, citocinas o quimiocinas "proinflamatorias" incluyen aquellas conocidas en la técnica de las que se sabe que están implicadas en la regulación por aumento de las reacciones inflamatorias. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 y GRO/KC.

Las quimiocinas son un grupo de citocinas que permiten la migración de los leucocitos desde la sangre a los tejidos en el sitio de la inflamación. Cuando se producen en cantidades excesivas, las quimiocinas pueden producir daños del tejido sano. El oncogén relacionado con el crecimiento (GRO/KC) es una quimiocina que atrae células inmunes al sitio de inflamación. Es el equivalente humano del quimioatrayente de neutrófilos inducido por citocinas de rata (CINC-1) y está relacionado funcionalmente con la familia de la interleucina 8.

Se ha demostrado que LGG inactivado inhibe la translocación del factor nuclear κ B (NF κ B). NF κ B es un factor de transcripción primario que se encuentra en todos los tipos de células y del que se piensa que desempeña un papel importante en el inicio de la inflamación. En la mayor parte de las células, NF κ B está presente como un complejo latente inactivo unido al inhibidor de κ B (I κ B) en el citoplasma. Cuando una célula recibe una cualquiera de una multitud de señales extracelulares, como de citocinas, antígenos bacterianos o radicales libres, NF κ B penetra rápidamente en el núcleo y activa genes que son responsables de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que la inhibición de NF κ B al inicio de la inflamación resulta en una disminución de la respuesta inflamatoria. Lawrence y col., *Possible New Role for NF κ B in the Resolution of Inflammation*, Nature Med. 7: 1291 (2001). Por lo tanto, la inhibición de NF κ B por medio del aporte complementario de LGG en la presente invención contribuye a la reducción o la prevención de la inflamación sistémica.

Según se verá en los ejemplos, se ha demostrado que LGG inactivado reduce la inflamación sistémica en lactantes alimentados con fórmula. Los niveles de CINC-1 y de varias citocinas en las ratas lactantes alimentadas con fórmula se redujeron a niveles similares a los de las ratas lactantes alimentadas con leche materna con un aporte complementario de LGG.

Según se verá en los ejemplos, también se ha demostrado que LGG inactivado reduce significativamente la producción de IL-8, disminuye la translocación de NF κ B y aumenta la producción de I κ B en el epitelio intestinal. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que LGG inactivado previenen además la ubiquitinación de I κ B, mientras que LGG vivo no.

Los ejemplos siguientes describen diversas realizaciones de la presente invención. Otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones en este documento serán evidentes para un experto en la técnica a partir de la

consideración o la práctica de la invención según se desvela en este documento. En los ejemplos, todos los porcentajes se dan en base al peso a no ser que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra el efecto LGG inactivado sobre la inflamación sistémica en crías recién nacidas de rata alimentadas con fórmula.

Materiales y procedimientos

En dos experimentos separados se asignaron al azar ratas Sprague-Dawley (Taconic, Germantown, NY, EE.UU.) lactantes a cuatro grupos de alimentación por gastrostomía con cinco ratas por grupo: un grupo de control (sin LPS ni LGG), un grupo con LPS, un grupo con LPS más LGG vivo y un grupo con LPS más LGG inactivado. Como controles de referencia se usaron ratas de la misma edad criadas por sus madres. La alimentación por gastrostomía, mediante el modelo "pup-in-the-cup" para ratas lactantes comenzó en el séptimo día de vida de las crías de rata. Los tubos de alimentación por gastrostomía se construyeron de secciones de 24 cm de tubo de polietileno que se insertaron en el estómago de las crías. La colocación de la gastrostomía se llevó a cabo con anestesia con isoflurano. Se conectaron bombas de jeringa controladas por un temporizador a los tubos de alimentación y se ajustaron para alimentar a las ratas durante los primeros 20 minutos de cada hora con una tasa de flujo dependiente del peso.

Durante un periodo de aclimatación de dos días, las crías de rata alimentadas por gastrostomía se alimentaron con un sucedáneo de leche de rata (RMS). Después del periodo de aclimatación, uno de los grupos alimentados con RMS recibió un complemento de 1×10^8 equivalentes de células por kg de peso corporal y día de LGG inactivado. LGG se inactivó por medio de un tratamiento térmico letal. Un segundo grupo recibió un complemento de 1×10^8 ufc/l por kg de peso corporal y día de LGG vivo. El tercer grupo se alimentó con RMS sin complemento de LGG de ningún tipo. Esta alimentación continuó durante seis días. Todos los grupos alimentados por gastrostomía recibieron la misma cantidad de grasa e hidratos de carbono y el componente de proteínas fue similar a la cantidad requerida para el crecimiento normal. Como controles de referencia se usaron ratas criadas por sus madres de la misma edad.

El lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 0127:B8 (LPS; Sigma, San Luis, MO, EE. UU.) se disolvió en agua mediante agitación en vórtex a una concentración de 2 mg/ml. Las ratas alimentadas por gastrostomía recibieron entre 0,25 y 0,5 mg/kg y día de LPS a través del tubo de gastrostomía a partir de dos días después del inicio de la alimentación artificial. Las crías recibieron el aporte complementario de LPS durante seis días. En estudios piloto se determinó que esta dosis resultaba en temblores ocasionales, piloerección y poca ganancia de peso, pero no se asoció con un aumento significativo de la mortalidad en un periodo de seis días.

Al final del periodo de tratamiento de seis días, las crías de rata se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico. El intestino delgado se extrajo y se separó en tres partes, íleo, yeyuno y duodeno, que se almacenaron a -80 °C para los ensayos enzimáticos y ELISA o se fijaron en formalina al 10 % tamponada a pH neutro para el análisis de la morfología intestinal. Los pulmones, el hígado y el plasma se almacenaron a -80 °C para análisis enzimáticos y ELISA.

Para analizar los resultados del peso corporal, el ensayo ELISA para CINC-1 y el ensayo multiplex de citocinas/quimiocinas se usó el programa estadístico Sigmastat (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). Todos los datos se indicaron como medias \pm desviación estándar (DE). Para determinar si había una diferencia significativa entre todos los grupos de tratamiento se usó un análisis de la varianza entre grupos de una vía (ANOVA). El método de Holm-Sidak se usó para comparaciones de parejas cuando el análisis ANOVA fue significativo para $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Crecimiento

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG en el crecimiento de las crías después de la alimentación por gastrostomía. Las crías de rata se pesaron diariamente después de la alimentación por gastrostomía y se compararon con los animales amamantados de referencia. Los animales amamantados crecieron más rápidamente que las crías con gastrostomía tratadas con LPS. El aporte de LGG vivo o inactivado a las crías alimentadas por gastrostomía tratadas con LPS no mejoró la ganancia de peso.

CINC-1

Tanto LGG vivo como LGG inactivado redujeron las concentraciones de CINC-1 en la presente invención. Las

concentraciones de CINC-1 se determinaron mediante kits de ensayo inmunométrico enzimático TiterZyme para el oncogén relacionado con el crecimiento /CINC-1 de rata (Assay Designs, Ann Arbor, MI, EE. UU.). Las muestras de tejido se aislaron de extractos celulares de tejidos enteros en el hígado, el intestino, el plasma y el pulmón. Se determinó la absorbancia a 450 nm y la concentración se calculó mediante la ecuación derivada de una curva lineal estándar.

Según se muestra en las figuras 1 a 3, los resultados de ELISA demostraron que LPS aumenta la concentración de CINC-1 en el hígado, los pulmones y el plasma. LGG tanto vivo como inactivado disminuyó la producción de CINC-1 inducida por LPS en el hígado (figura 1) y el plasma (figura 2) ($p < 0,05$) y también mostró una tendencia ($p = 0,09$) en el pulmón (figura 3).

La figura 1 ilustra que el aporte complementario de LGG vivo redujo la concentración de CINC-1 en el hígado en aproximadamente el 50 % en comparación con el grupo con LPS. Sin embargo, LGG inactivado redujo la concentración de CINC-1 en el hígado en aproximadamente el 75 % en comparación con el grupo con LPS. Por lo tanto, LGG inactivado tuvo un efecto reductor significativamente mayor que LGG vivo en la concentración de CINC-1 en el hígado, lo que indica un mayor efecto antiinflamatorio. De manera similar, la figura 2 ilustra que la concentración de CINC-1 en el plasma fue inferior en el grupo con LGG inactivado que en el grupo con LGG vivo. En el pulmón, tanto LGG vivo como LGG inactivado redujeron la concentración de CINC-1 en un grado similar (figura 3).

GRO/KC

Según se muestra en las figuras 4 y 5, el ensayo multiplex de citocinas mostró reducciones similares de las concentraciones de GRO/KC en el hígado y en los pulmones. LGG inactivado disminuyó la concentración de GRO/KC en el hígado en mayor medida que LGG vivo, lo que indica un mayor efecto antiinflamatorio (figura 4). Tanto LGG vivo como LGG inactivado redujeron la concentración de GRO/KC en un grado similar en los pulmones (figura 5).

Los niveles reducidos de CINC-1 y GRO/KC que se observaron en los pulmones en el presente experimento indican que el efecto antiinflamatorio de LGG inactivado se extiende a órganos distales. Por lo tanto, el efecto antiinflamatorio de LGG inactivado es de naturaleza verdaderamente sistémica.

En el hígado, el aporte complementario de LGG redujo la concentración de CINC-1 a un nivel de hecho inferior al de las crías de rata alimentadas con leche materna. En el pulmón y en el plasma, LGG inactivado redujo la concentración de CINC-1 a un nivel muy similar al de las crías de rata alimentadas con leche materna. Estos resultados demuestran que LGG inactivado tiene la capacidad de reducir la inflamación sistémica en un lactante alimentado con fórmula a un nivel similar, y en ocasiones inferior al de un lactante amamantado.

Citocinas y quimiocinas

LGG tanto vivo como inactivado también redujo las concentraciones de citocina y quimiocina. Se adquirieron kits de esferas multiplex de LINCO Research, Inc. (St. Charles, MO. EE. UU.). Las citocinas/quimiocinas se analizaron mediante un kit que comprendía: el factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocíticos (GM-CSF), interferón λ (INF- λ), interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-18, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), GRO/KC (CINC-1 de rata) y TNF- α . El ensayo multiplex se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se generaron curvas estándar para cada citocina/quimiocina mediante las concentraciones de referencia suministradas por los fabricantes. Los datos en bruto (intensidad de fluorescencia media) se analizaron mediante el programa de cuantificación MasterPlex (MiraiBio, Inc., Alameda, CA, EE. UU.) para obtener valores de concentración.

Según se muestra en la figura 6, la concentración de IL-1 β en el hígado fue significativamente superior en las crías alimentadas por gastrostomía y tratadas con LPS que en las crías de control. Tanto LGG vivo como LGG inactivado debilitaron significativamente el aumento de IL-1 β inducido por LPS. De hecho, LGG inactivado redujo la concentración de IL-1 β en mayor medida que el aporte complementario de LGG vivo. LGG inactivado redujo la expresión de IL-1 β a un nivel similar al de las crías de control. Por lo tanto, esta parte del experimento ilustra adicionalmente la actividad antiinflamatoria de LGG inactivado.

Como conclusión, estos resultados demuestran que el aporte complementario de LGG inactivado reduce la inflamación sistémica. Además, los resultados demuestran que LGG inactivado reduce la inflamación sistémica en los lactantes alimentados con fórmula a un nivel similar al de los lactantes amamantados. Esto se ilustra en los resultados descritos en este documento a través de la comparación del grupo tratado con LGG inactivado y el grupo alimentado exclusivamente con leche materna. En varios casos, la administración de LGG inactivado resulta en una respuesta inflamatoria que es muy similar a la del grupo alimentado con leche materna.

Ejemplo 2

5 Este ejemplo ilustra adicionalmente el efecto de LGG inactivado sobre la inflamación de crías de rata recién nacidas alimentadas con fórmula.

10 Se pretrataron células epiteliales intestinales con LGG vivo o LGG inactivado por UV a una concentración de 1×10^8 ufc/l y después se estimularon con 500 ng/ml de flagelina. La producción de IL-8 se midió mediante ELISA. La expresión de κB y de κB ubiquitinado (UbQ- κB) se midieron por inmunotransferencia e inmunoprecipitación. La localización de κB se evaluó por tinción inmunofluorescente.

15 Durante el experimento, la flagelina indujo un aumento significativo de la producción celular de IL-8 ($p < 0,05$). Las células pretratadas con LGG vivo o con LGG inactivado por UV y estimuladas después por flagelina mostraron un cambio significativo ($p < 0,05$) en IL-8, translocación nuclear de NF κB , κB y UbQ- κB . Los resultados se muestran en la tabla 1. Las flechas dirigidas hacia arriba indican un aumento del parámetro, mientras que las flechas dirigidas hacia abajo indican una disminución del parámetro.

Tabla 1: Cambios en la expresión debidos al aporte complementario de LGG vivo o inactivado.

	IL-8	Translocación de NF κB	κB	UbQ- κB
Solo flagelina	↑	↑	↓	↑
LGG vivo	↓	↓	↑	↑
LGG inactivado	↓	↓	↑	↓

20 Según se muestra en la tabla1, la flagelina indujo un aumento significativo de la producción de IL-8 por las células del epitelio intestinal ($p < 0,05$). La producción de IL-8 disminuyó significativamente en presencia de LGG, tanto vivo como inactivado. Además, las células estimuladas por flagelina mostraron una translocación nuclear de ~~NF~~ κB que fue prevenida tanto por LGG vivo como LGG inactivado. La flagelina disminuyó la producción de ~~κB~~ pero este efecto se invirtió por el pretratamiento con LGG, tanto vivo como inactivado ($p < 0,05$). La flagelina y LGG vivo aumentaron UbQ- κB ($p < 0,05$), mientras que LGG inactivado disminuyó UbQ- κB .

30 Este ejemplo ilustra que tanto LGG vivo como LGG inactivado son eficaces en la disminución de la producción de IL-8, una citocina proinflamatoria y por lo tanto tienen un efecto antiinflamatorio. Dado que la flagelina y LGG vivo aumentaron UbQ- κB , pero LGG inactivado disminuyó UbQ- κB , LGG inactivado probablemente opera a través de un mecanismo que previene la ubiquitinación de ~~κB~~ κB , mientras que LGG vivo probablemente no lo hace. Por consiguiente, este ejemplo ilustra adicionalmente que LGG vivo y LGG inactivado operan probablemente a través de mecanismos diferentes y pueden tener efectos sinérgicos al administrarlos conjuntamente.

35 Se ha demostrado que la presente invención reduce la inflamación en el hígado, el plasma y los pulmones. Dado que la presente invención puede usarse para mejorar el estado inflamatorio, también puede prevenir la aparición de infecciones o enfermedades perjudiciales.

40 La discusión de las referencias citadas en esta memoria descriptiva que incluyen sin limitación todos los artículos, publicaciones, patentes, solicitudes de patente, presentaciones, textos, informes, manuscritos, folletos, libros, divulgaciones en internet, artículos de revistas, periódicos y similares en este documento solamente pretenden resumir las afirmaciones realizadas por sus autores y no se admite que ninguna referencia constituya técnica anterior. Los solicitantes se reservan el derecho de objetar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

45 Estas y otras modificaciones y variaciones de la presente invención pueden ser realizadas por los expertos en la técnica. El alcance de la presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición nutricional para uso en la prevención, el tratamiento o la reducción de la inflamación sistémica en un niño o un lactante que comprende *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado en una cantidad eficaz para proporcionar entre 1×10^4 y 1×10^{10} equivalentes de células por kg de peso corporal y día de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado.
- 10 2. La composición nutricional de la reivindicación 1, en que la cantidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado es suficiente para proporcionar entre 1×10^6 y 1×10^9 equivalentes de células por kg de peso corporal y día.
3. La composición nutricional de la reivindicación 1, que comprende además al menos otro probiótico inactivado.
- 15 4. La composición nutricional de la reivindicación 1, que comprende además al menos un probiótico viable.
5. La composición nutricional de la reivindicación 4, en que el probiótico viable comprende *Lactobacillus rhamnosus* GG viable.
- 20 6. La composición nutricional de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica en lactantes alimentados con fórmula que comprende además al menos un prebiótico.
7. La composición nutricional de la reivindicación 1, que comprende además al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga.
- 25 8. La composición nutricional de la reivindicación 7, en que el ácido graso poliinsaturado de cadena larga se selecciona del grupo que consta de DHA, ARA y combinaciones de estos.
9. La composición nutricional de la reivindicación 8, que comprende una fórmula para lactantes.
- 30 10. Uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado para la preparación de una composición nutricional para la prevención, el tratamiento o la reducción de la inflamación sistémica en un niño o un lactante, en que la composición nutricional comprende *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado en una cantidad eficaz para proporcionar entre 1×10^4 y 1×10^{10} equivalentes de células por kg de peso corporal y día de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado.
- 35 11. El uso de la reivindicación 10, en que la cantidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado es suficiente para proporcionar entre 1×10^6 y 1×10^9 equivalentes de células por kg de peso corporal y día.
- 40 12. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en que la composición nutricional comprende *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado en una cantidad eficaz para proporcionar 1×10^8 equivalentes de células por kg de peso corporal y día de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado.

Figura 1

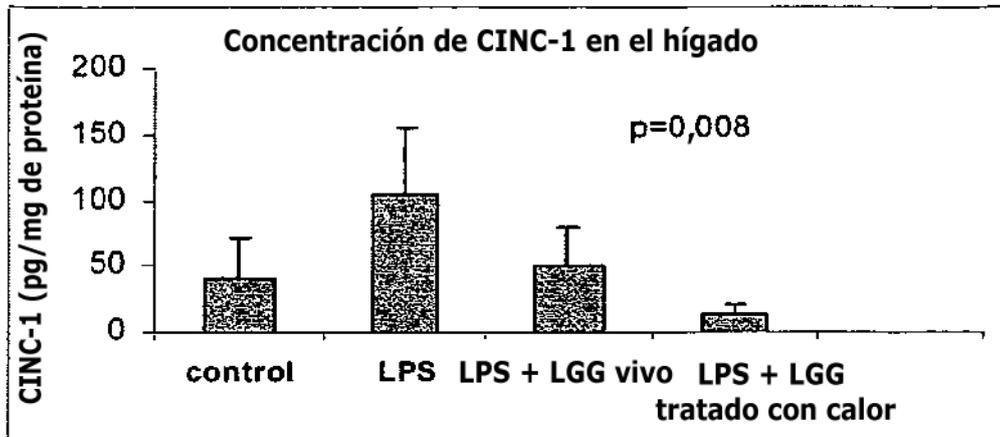


Figura 2

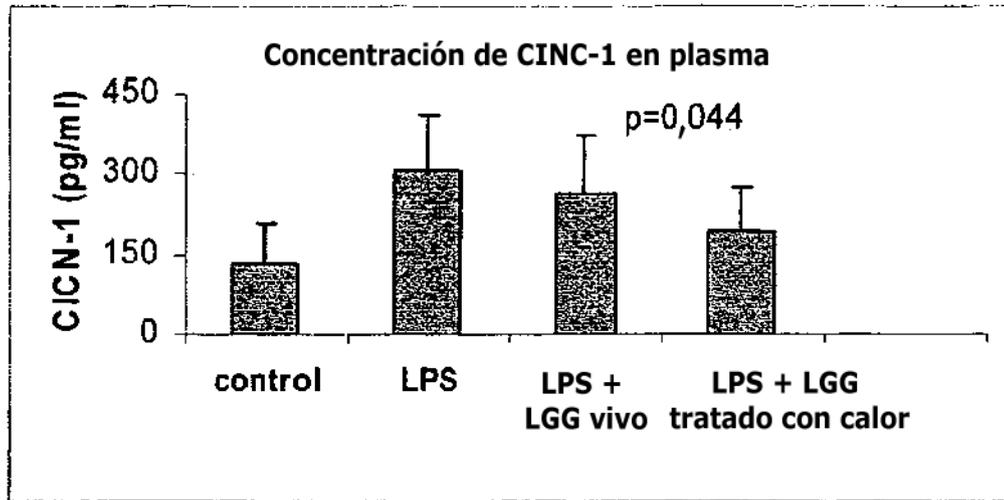


Figura 3

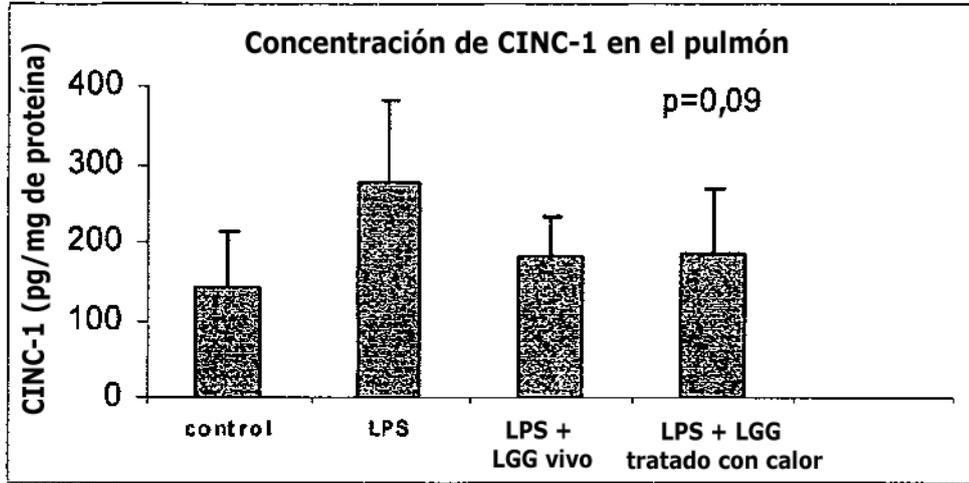


Figura 4

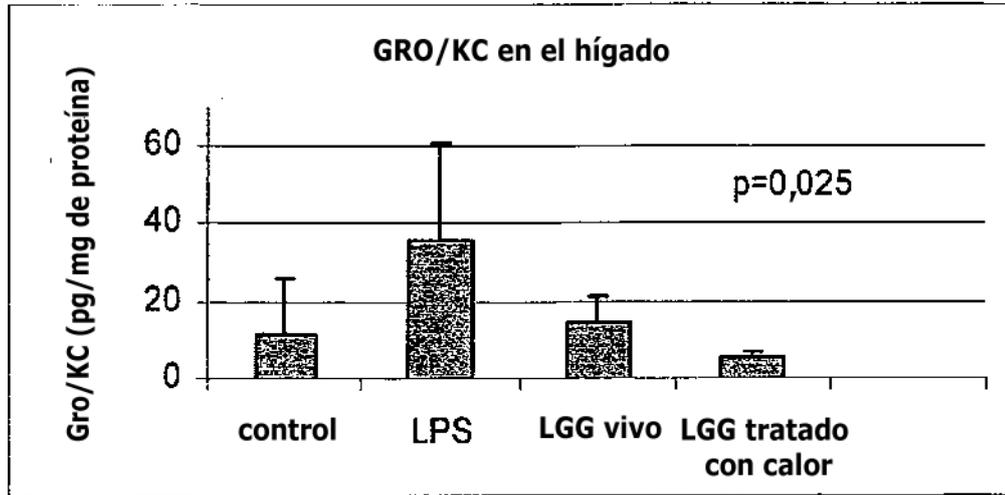


Figura 5

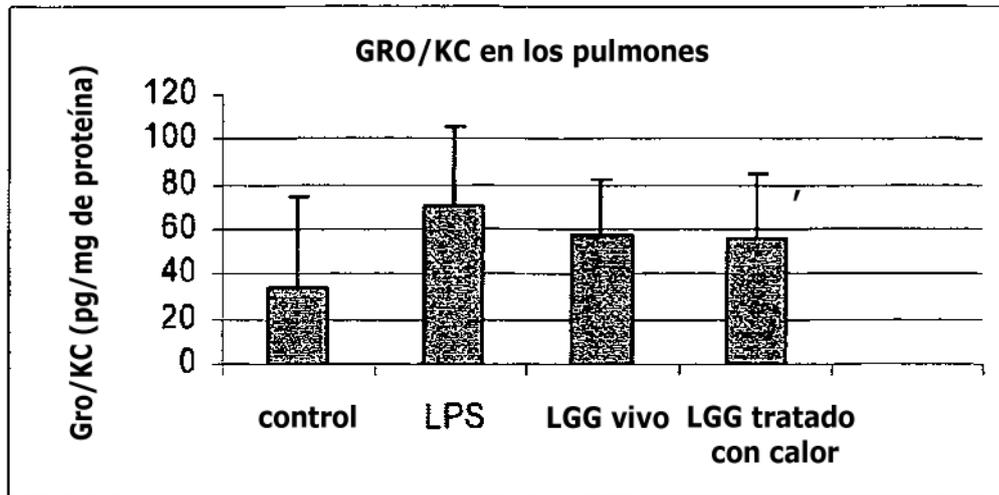


Figura 6

