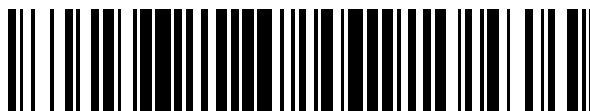


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 198**

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: **08730508 .2**  
96 Fecha de presentación: **22.02.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2114423**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54 Título: **Producto que contiene un probiótico inactivado para bebés**

30 Prioridad:  
**28.02.2007 US 904122 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.10.2012**

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

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

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 388 198 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**

Producto que contiene un probiótico inactivado para bebés

**Referencia cruzada a patentes y solicitudes de patente relacionadas**

5 Esta solicitud es una solicitud de patente no provisional y reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente de EE.UU. N° 60/904.122, presentada en 28 de febrero de 2007.

**Antecedentes de la invención****(1) Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a un producto que contiene al menos un probiótico inactivado y a su utilización.

**10 (2) Descripción de la técnica relacionada**

La respuesta inflamatoria es un intento del cuerpo de restaurar y mantener la homeóstasis tras la invasión por un agente infeccioso, ataque antigénico, o daño físico, químico o traumático. La inflamación localizada está contenida en una región específica y puede presentar síntomas variables, incluyendo rojez, hinchazón, calor y dolor.

15 Aunque la respuesta inflamatoria se considera generalmente una respuesta saludable a la lesión, el sistema inmunitario puede presentar una respuesta fisiológica indeseable si no se regula apropiadamente. En esta situación, el sistema inmunitario del cuerpo, normalmente protector, causa daños a su propio tejido, tratando el tejido sano como si estuviese infectado o fuese anormal.

20 Alternativamente, si existe una lesión, la respuesta inflamatoria puede ser desproporcionada con la amenaza que causa la lesión. Cuando esto ocurre, la respuesta inflamatoria puede causar más daño al cuerpo que el que habría producido la propia sustancia.

25 Se ha descubierto que la respuesta inflamatoria consiste en parte en una expresión incrementada tanto de citoquinas proinflamatorias como antiinflamatorias. Las citoquinas son proteínas biológicamente activas de bajo peso molecular, implicadas en la coordinación de las respuestas inmunológicas e inflamatorias y la comunicación entre poblaciones de células inmunológicas específicas. Diversos tipos celulares producen citoquinas durante las reacciones inflamatorias, incluyendo neutrófilos, monocitos y linfocitos.

Existen múltiples mecanismos por los que las citoquinas generadas en los sitios inflamatorios influyen la respuesta inflamatoria. Si una respuesta proinflamatoria no se contrarresta con éxito por las citoquinas antiinflamatorias, sin embargo, se puede producir una inflamación sistémica incontrolada.

30 En contraste con la inflamación localizada, la inflamación sistémica se extiende ampliamente a través del cuerpo. Este tipo de inflamación puede incluir inflamación localizada en sitios específicos, pero también puede estar asociada con síntomas de tipo gripal, incluyendo fiebre, tiritonas, fatiga o falta de energía, dolores de cabeza, pérdida de apetito y rigidez muscular. La inflamación sistémica puede conducir a la degradación, catabolismo e hipermetabolismo de proteínas. Como consecuencia, la estructura y función de órganos esenciales, como el músculo, corazón, sistema inmunológico e hígado pueden estar comprometidas y pueden contribuir al fallo multiorgánico y a mortalidad. Jeschke, et al., *Insulin Attenuates the Systemic Inflammatory Response to Thermal Trauma*, Mol. Med. 8(8): 443-450 (2002). Aunque se han logrado enormes progresos en la comprensión de los mecanismos de la inflamación sistémica, la tasa de mortalidad debida a esta alteración permanece inaceptablemente alta.

40 Las infecciones del tracto respiratorio son extremadamente comunes, especialmente entre los bebés. En el primer año de vida, los bebés son proclives a infecciones recurrentes del tracto respiratorio, experimentando frecuentemente entre tres y seis infecciones sólo durante ese año. Aproximadamente el 6% de los bebés de menos de un año de edad son hospitalizados por infecciones del tracto respiratorio inferior cada año sólo en Estados Unidos.

45 Las infecciones respiratorias y sus síntomas pueden variar desde leves hasta graves, dependiendo del tipo de virus y de la localización de la infección. Las infecciones respiratorias superiores se manifiestan frecuentemente como resfriados comunes, causando inflamación e hinchazón del revestimiento de la nariz, garganta y senos. La influenza, normalmente conocida como gripe, es una infección vírica muy contagiosa del tracto respiratorio superior. Los síntomas de la gripe incluyen fiebre, tiritonas, dolor de cabeza, dolores musculares, mareo, tos, inflamación de garganta, goteo nasal, náuseas y diarrea. Otra infección del tracto respiratorio superior, el crup, produce una tos muy profunda y diversos grados de dificultad respiratoria, principalmente al inhalar.

50 Las infecciones del tracto respiratorio inferior se consideran generalmente más graves que las infecciones respiratorias superiores. El virus sincitial respiratorio (RSV) es la causa más frecuente de infecciones del tracto respiratorio inferior en bebés y niños menores de cuatro años, Van Woensel, J., et al., *Viral Lower Respiratory Tract*

*Infection in Infants and Young Children*, BMJ 327:3640 (2003). Este es un virus tan común que virtualmente todos los niños han sido infectados con RSV a la edad de tres años. En la mayoría de los bebés y niños, RSV es una infección respiratoria leve que es indistinguible de un resfriado común. Normalmente produce congestión nasal, flujo nasal y tos.

5 La protección frente al RSV implica respuestas de células T y B y respuestas de anticuerpos (IgM, IgG e IgA), así como otras respuestas del sistema inmunológico que se activan mediante infecciones víricas y bacterianas. Se ha sugerido una conexión entre la infección por RSV en la infancia y el desarrollo de sibilancia, asma y atopía más tarde durante la infancia. Por tanto, la limitación de las infecciones por RSV podría evitar complicaciones respiratorias graves que se prolonguen en la infancia.

10 La bronquitis es una infección respiratoria inferior que afecta a los tubos bronquiales, produciendo estrechamiento e hinchazón debidos a la inflamación vírica. La bronquiolitis es similar a la bronquitis, pero se produce principalmente en bebés. Es una inflamación de los tubos de calibre inferior de la red de ramificaciones de los bronquios. La infección produce respiración dificultosa, tos frecuente y dramática y sibilancia y puede requerir hospitalización.

15 La infección respiratoria inferior que es probablemente la más grave para bebés es la neumonía. La neumonía se produce por una infección en los alvéolos, haciendo que se rellenen de fluido, frecuentemente de naturaleza purulenta y espesa, que interfiere con el intercambio adecuado de dióxido de carbono. La gravedad de la neumonía dependerá de la cantidad de tejido pulmonar implicado.

20 La mayoría de las infecciones superiores e inferiores se producen por virus para los que no está disponible actualmente ninguna prevención o tratamiento específico. Algunas infecciones respiratorias, incluyendo la influenza, se pueden prevenir con una vacunación. Sin embargo, incluso cuando las vacunaciones se desarrollan para infecciones respiratorias específicas, son caras y no están disponibles universalmente. De forma similar, los fármacos para tratar estas infecciones tienen una disponibilidad limitada y son caros. Por tanto, sería útil proporcionar un método no medicinal para el tratamiento o prevención de infecciones respiratorias en bebés.

25 Las infecciones del tracto respiratorio frecuentes están asociadas a menudo con la otitis media aguda (AOM), también conocida como infección del oído medio. La AOM se caracteriza por una inflamación aguda, de duración corta y con fluido en el oído medio. La AOM puede estar acompañada por rinitis, tos, fiebre, inflamación de garganta, dolor de oído, hipoacusia, falta de descanso, irritabilidad, pérdida de apetito, vómitos o diarrea. La otorrea purulenta a través de una membrana timpánica perforada también se considera que constituye AOM.

30 El cincuenta por ciento de los niños han tenido al menos un episodio de AOM alrededor del año de edad. El ochenta por ciento de los niños han tenido al menos un episodio alrededor de su tercer cumpleaños. Entre uno y tres años, el 35% de los niños habrán tenido episodios recurrentes de AOM.

35 La AOM puede estar causada por virus o bacterias. Las cepas bacterianas más comunes que pueden causar AOM son *Streptococcus pneumoniae* (35% de casos), *Haemophilus influenzae* (30% de casos) y *Moraxella catarrhalis* (10% de casos). Debido a que las cepas bacterianas causan frecuentemente la infección, la AOM se trata normalmente mediante la administración de antibióticos. De hecho, se escriben más prescripciones de antibióticos para AOM que para cualquier otra enfermedad en la infancia.

40 A menudo, el que la respuesta de citoquina sea pro o antiinflamatoria depende del equilibrio de microorganismos individuales que colonicen el lumen intestinal en cualquier momento particular. Se sabe que la superficie mucosa del tracto intestinal está colonizada por una colección de microorganismos enormemente grande, compleja y dinámica. La composición de la microflora intestinal varía a lo largo del tracto digestivo, así como en diferentes microhábitats, como la capa mucosa epitelial, la capa mucosa profunda de las criptas, y la superficie de las células epiteliales de la mucosa. La colonización específica depende de factores externos e internos, incluyendo moléculas disponibles luminalmente, calidad del mucus e interacciones microbio-hospedador y microbio-microbio. Murch, S. H., *Toll of Allergy Reduced by Probiotics*, Lancet, 357:1057-1059 (2001).

45 Estos microorganismos, que constituyen la microflora del intestino, están implicados activamente en la respuesta inmunológica. Interaccionan con el epitelio en condiciones de relaciones beneficiosas mutuas para ambas partes (simbiosis) o en condiciones de beneficio sólo para una parte, sin ser nocivas para la otra (comensalismo). Hooper, et al., *How Host-Microbial Interactions Shape the Nutrient Environment of the Mammalian Intestine*, Annu. Rev. Nutr. 22:283-307 (2002). De hecho, están apareciendo evidencias considerables que muestran una fuerte interacción o interferencia entre la microflora intestinal y la población diversa de células en la mucosa intestinal. Bourlioux, et al., *The Intestine and its Microflora are Partners for the Protection of the Host: Informe en the Danone Symposium "The Intelligent Intestine"*, llevado a cabo en París, Jun. 14, 2002, Am. J. Clin. Nutr. 78:675 (2003); Hooper, L. V. & Gordon, J. I., *Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut*, Sci. 292:1115 (2001); Haller, et al., *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 inmunológicas específicas, tanto a nivel local como sistémico en adultos. . Isolauri, E., et al., *Probiotics: Effects on Immunity*, Am. J. Clin. Nutr. 73:444S-50S (2001).

Se sabe que la microflora intestinal en bebés está mucho menos desarrollada que la de un adulto. Mientras que la microflora del humano adulto consiste en más de  $10^{13}$  microorganismos y cerca de 500 especies, siendo algunas nocivas y algunas beneficiosas, la microflora de un bebé contiene sólo una fracción de estos microorganismos, tanto en número absoluto como en diversidad de especies. Los bebés nacen con un intestino estéril, pero adquieren flora intestinal desde el canal del parto, su medio inicial, y lo que ingieren. Debido a que la población de la microflora intestinal es muy inestable en la vida neonatal temprana, a menudo es difícil para el intestino del bebé mantener el delicado equilibrio entre las bacterias nocivas y beneficiosas, reduciendo por tanto la capacidad del sistema inmunológico de funcionar normalmente.

Es especialmente difícil para bebés alimentados con preparados para lactantes mantener este equilibrio, debido a las diferencias entre las especies bacterianas en el intestino de un bebé alimentado con preparados para lactantes o con leche materna. Las deposiciones de bebés alimentados con leche materna contienen predominantemente *Bifidobacterium*, siendo *Streptococcus* y *Lactobacillus* los contribuidores menos comunes. En contraste, la microflora de los bebés alimentados con leche artificial es más diversa, conteniendo *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, así como especies más patógenas, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* y *Clostridia*. Las variadas especies de *Bifidobacterium* también difieren en las deposiciones de bebés alimentados con leche materna y con preparados para lactantes. Se han propuesto diversos factores como causa de la diferente flora fecal de bebés alimentados con leche materna y preparados para lactantes, incluyendo el contenido inferior y la composición diferente de proteínas en la leche humana, un contenido de fósforo inferior en la leche humana, la gran variedad de oligosacáridos en la leche humana y los numerosos mediadores humorales y celulares de la función inmunológica en la leche materna. Agostoni, et al., *Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition*, J. Pediatr. Gastro. Nutr. 38:365-374 (April 2004).

Debido a que la microflora de los bebés alimentados con preparados para lactantes es tan inestable y la microflora del intestino participa ampliamente en la estimulación de la inmunidad del intestino, los bebés alimentados con preparados para lactantes son más propensos a desarrollar enfermedades inflamatorias. Muchas de las enfermedades principales que afectan a los bebés, incluyendo la enfermedad pulmonar crónica, leucomalacia periventricular, meningitis neonatal, hepatitis neonatal, sepsis y enterocolitis necrotizante, son de naturaleza inflamatoria. Dependiendo de la enfermedad particular, la inflamación asociada puede producirse en un órgano específico, como el pulmón, cerebro, hígado o intestino, o la inflamación puede ser verdaderamente de naturaleza sistémica.

Por ejemplo, la enfermedad pulmonar crónica hace que los tejidos internos de los pulmones se inflamen, mientras que la meningitis neonatal implica inflamación de los revestimientos del cerebro y la espina dorsal. La leucomalacia periventricular está causada por daño inflamatorio en el área periventricular del cerebro en desarrollo. La enterocolitis necrotizante causa inflamación del intestino que puede producir la destrucción de parte o todo el intestino, y la hepatitis neonatal implica la inflamación del hígado que se produce en la infancia temprana. La sepsis, también conocida como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, es una enfermedad grave causada por una infección incontenible del torrente sanguíneo por bacterias productoras de toxinas. En esta enfermedad, los patógenos en el torrente sanguíneo provocan una respuesta inflamatoria a lo largo de la totalidad del cuerpo.

Los bebés prematuros y críticamente enfermos también representan un serio reto en términos de desarrollar la inmunidad intestinal y evitar la inflamación sistémica. Los bebés prematuros o críticamente enfermos son colocados a menudo inmediatamente en incubadoras estériles, en las que permanecen sin exposición a las poblaciones bacterianas a las que se expondría normalmente un bebé sano, nacido a término. Esto puede retrasar o dificultar el proceso natural de colonización. Estos bebés son tratados también frecuentemente con antibióticos de amplio espectro, que matan a las bacterias comensales que intentan colonizar el tracto intestinal del bebé. Adicionalmente, estos bebés son nutridos frecuentemente por medio de preparados para lactantes, más que por leche materna. Cada uno de estos factores hace que la microflora intestinal del bebé no se desarrolle adecuadamente, causando así o precipitando la inflamación sistémica con peligro para la vida.

En los últimos años, se ha sugerido la complementación de bacterias probióticas en la dieta de los bebés alimentados con preparados para lactantes, a fin de fomentar la colonización del intestino con microorganismos beneficiosos. Las bacterias probióticas son organismos vivos que ejercen efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador. Fuller, R. *Probiotics in Man and Animals*, J. Appl. Bacteriol. 66: 365-78 (1989).

Aunque que las bacterias probióticas viables pueden ser efectivas en la normalización de la microflora del intestino, ha habido muy pocos estudios publicados valorando su seguridad en bebés prematuros e inmunosuprimidos. Estas poblaciones especiales tienen una barrera de defensa intestinal inmadura que incrementa el riesgo de translocación de bacterias lumbinales, causando un potencialmente elevado de infecciones. En muchos casos los probióticos viables no se recomiendan para pacientes inmunosuprimidos, pacientes poscirugía cardíaca, pacientes con disfunción pancreática o pacientes con sangre en las heces. Se ha descrito al menos una muerte debida a complementación probiótica en un individuo inmunosuprimido. MacGregor G., et al. *Yoghurt biotherapy: contraindicated in immunosuppressed patients?* Postgrad Med J. 78: 366-367 (2002).

WO2006/113034 describe el tratamiento de la inflamación sistémica en un bebé alimentado con preparados para lactantes, mediante la administración de una composición que comprende *Lactobacillus rhamnosus* vivo, en

combinación con un ácido graso poliinsaturado de cadena larga.

WO2004/069156 describe el uso de composiciones que comprenden bacterias probióticas inactivadas, incluyendo *Lactobacillus rhamnosus*, para tratar enfermedades inflamatorias, incluyendo inflamación gastrointestinal y/o inflamación estimulada por antígeno/alérgica.

- 5 Por tanto, para pacientes inmunosuprimidos o bebés prematuros, sería útil proporcionar un complemento no viable que pueda tratar o evitar la inflamación sistémica. Una alternativa no viable a los probióticos activos o viables puede presentar ventajas adicionales como una vida de almacenamiento más larga. Los probióticos activos o viables son sensibles al calor, humedad y luz, e idealmente deberían refrigerarse para mantener la viabilidad. Incluso con estas precauciones, la vida de almacenamiento de un probiótico típico es relativamente corta. Una alternativa no viable a los probióticos vivos, solventaría la necesidad de refrigeración y proporcionaría un producto con una vida de almacenamiento más larga. El producto se podría distribuir, por tanto, a regiones del mundo sin refrigeración fácilmente disponible. Una alternativa no viable a los probióticos proporcionaría adicionalmente menos riesgo de interacción con otros componentes alimentarios, como la fermentación y los cambios en el sabor, textura y frescura del producto. Consecuentemente, sería ventajoso proporcionar un método para reducir o prevenir la inflamación sistémica en bebés alimentados con preparados para lactantes, que comprenda la administración de probióticos inactivados.

### Sumario de la invención

- 20 En resumen, por tanto, la presente invención se refiere a un nuevo producto que comprende al menos un probiótico inactivado, en el que el probiótico es no viable pero los componentes celulares del probiótico mantienen atributos reactivos biológicos iguales o similares a los de las células viables o no inactivadas del probiótico.

Así mismo, se describe un método de utilización de una o más cepas inactivadas de probióticos para ventajas reactivas biológicas iguales o similares a las del probiótico viable o vivo.

- 25 Así mismo, se describe un método para tratar, prevenir o reducir la inflamación sistémica y/o respiratoria en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un probiótico inactivado, en el que el probiótico en su forma viable es útil para tratar, prevenir o reducir tal inflamación sistémica y/o respiratoria en un sujeto.

- 30 Así mismo, se describe un método para tratar, prevenir o reducir la inflamación respiratoria en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un probiótico inactivado, en el que el probiótico en su forma viable es útil para tratar, prevenir o reducir tal inflamación respiratoria en un sujeto.

Así mismo, se describe un método para prevenir o reducir la liberación sistémica de una o más citoquinas o quimioquinas proinflamatorias en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un probiótico inactivado.

- 35 Así mismo, se describe un método para tratar, prevenir o reducir la inflamación sistémica en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un probiótico inactivado, en combinación con al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (LCPUFA) y/o al menos un probiótico viable. En realizaciones particulares, el LCPUFA puede ser ácido docosahexaenoico (DHA) o ácido araquidónico (ARA).

- 40 Entre las diversas ventajas encontradas que se pueden lograr mediante la presente invención, está el que puede reducir o evitar las inflamaciones sistémicas o respiratorias. La invención puede reducir también la inflamación del hígado, plasma, pulmones e intestino. Adicionalmente, la invención reduce o evita la liberación de varias citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, incluyendo interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-8, CINC-1 y las concentraciones de oncogén relacionado con el crecimiento (GRO/KC). Debido a que la presente invención se puede usar para mejorar los estados inflamatorios, también puede evitar el establecimiento de infecciones o enfermedades deletéreas.

### 45 Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente invención, se hace referencia ahora a las siguientes descripciones, tomadas conjuntamente con los dibujos que las acompañan.

- 50 La Figura 1 ilustra el efecto de probióticos activos e inactivados sobre la producción del péptido quimioatrayente-1 (CINC-1) de neutrófilos inducidos por citoquina en el hígado, usando el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) inactivado, un probiótico inactivado ejemplificante, está marcado como "LGG termotratado".

La Figura 2 ilustra el efecto de probióticos activos e inactivados sobre la producción del péptido CINC-1 en el plasma, usando ELISA. LGG inactivado está marcado como "LGG termotratado".

La Figura 3 ilustra el efecto de probióticos activos e inactivados sobre la producción del péptido CINC-1 en el pulmón, usando ELISA. LGG inactivado está marcado como "LGG termotratado".

La Figura 4 ilustra el efecto de probióticos activos e inactivados sobre la producción de oncogén relacionado con el crecimiento (GRO/KC) en el hígado, usando un ensayo multiplex de citoquina. LGG inactivado está marcado como "LGG termotratado".

La Figura 5 ilustra el efecto de probióticos activos e inactivados sobre la producción de GRO/KC en el pulmón, usando un ensayo multiplex de citoquina. LGG inactivado está marcado como "LGG termotratado".

La Figura 6 ilustra el efecto de probióticos activos e inactivados sobre las concentraciones de interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en el hígado, usando un ensayo multiplex de citoquina. LGG inactivado está marcado como "LGG termotratado".

## 10 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A continuación se hará referencia en detalle a las realizaciones de la invención, uno o más ejemplos de las cuales se exponen más adelante. Cada ejemplo se proporciona como medio de explicación de la invención, no como una limitación de la invención. De hecho, será evidente para los expertos en la materia que se pueden realizar varias modificaciones y variaciones en la presente invención sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, se pueden usar características ilustradas o descritas como parte de una realización en otra realización, produciendo otra realización adicional.

Por tanto, se pretende que la presente invención cubra modificaciones y variaciones tales que se incluyan en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros objetos, características y aspectos de la presente invención se describen o son obvios partiendo de la siguiente descripción detallada. El experto en la materia tendrá que comprender que la presente discusión es sólo una descripción de realizaciones ejemplares, y no se considera que limite los aspectos más amplios de la presente invención.

En la presente invención se usan las siguientes abreviaturas: LGG, *Lactobacillus rhamnosus* GG; ICPUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; LPS, lipopolisacárido; IL, interleuquina; CINC-1, quimioatrayente-1 de neutrófilos inducidos por citoquinas; GRO/KC, oncogén relacionado con el crecimiento; ELISA, ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas; RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa; ANOVA, análisis de varianza; SD, desviación estándar; RMS, sustituto de leche de rata; TLRs receptores de tipo toll ("toll-like receptors"); factor nuclear kappa B, NF- $\kappa$ B; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; ARA, ácido araquidónico.

Los TLRs son una familia de receptores de reconocimiento de vertebrados. Han evolucionado como moléculas clave en la inmunidad innata y adaptativa. Juegan un papel crucial en el reconocimiento de componentes microbianos conservados. Los componentes de la pared celular, DNA, y RNA bicatenario de un organismo son reconocidos aparentemente por diferentes TLRs. Estos componentes derivados de bacterias (bien sea LPC, peptidoglicano o DNA CpG) son ligandos TLR naturales que conservan propiedades inmunomoduladoras fuertes en ausencia de las consecuencias patógenas que resultarían típicamente de la proliferación bacteriana normal (diarrea, destrucción de tejidos, inflamación sistémica, permeabilidad de barrera). Los componentes bacterianos actúan típicamente sobre la respuesta inmunológica adaptativa, mientras que las bacterias son sensibilizadas por la respuesta inmunológica innata.

El término "probiótico" significa un microorganismo vivo, activo o viable, que ejerce efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador.

El término "prebiótico" significa un ingrediente alimentario no digerible, que estimula el crecimiento y/o actividad de los probióticos.

Según se usa aquí, el término "tratar" significa mejorar, aliviar o remediar una enfermedad, alteración o síntoma de una enfermedad o estado.

El término "reducir" significa disminuir en extensión, cantidad o grado.

El término "prevenir" significa detener o impedir una enfermedad, alteración o síntoma de una enfermedad o estado a través de alguna acción.

El término "sistémico", según se usa aquí, significa relacionado con el cuerpo entero o que afecta al mismo.

Los términos "infección respiratoria" o "enfermedad respiratoria" significan una enfermedad o infección que afecta al grupo de órganos responsables de llevar el oxígeno del aire al torrente circulatorio y de expeler el dióxido de carbono.

Los términos "probiótico inactivado" o "LGG inactivado" significan que la actividad metabólica interna o la capacidad reproductiva del probiótico u organismo LGG, se ha reducido o destruido. El "probiótico inactivado" o "LGG inactivado", se cree que mantiene todavía, a nivel celular, al menos una parte de sus ligandos TLR naturales, que a

su vez mantienen al menos una parte de sus propiedades inmunomoduladoras. Según se usa aquí, el término “inactivado” es sinónimo de “no viable”.

Los términos “cantidad terapéuticamente efectiva” se refieren a una cantidad que produce una mejora o curación de la enfermedad, alteración o síntomas de la enfermedad o estado.

- 5 El término “pretérmino” significa un bebé nacido antes de la finalización de la semana 37 de la gestación.

El término “bebé” significa un ser humano posnatal que es menor de aproximadamente 1 año de edad.

El término “niño” significa un ser humano entre las edades de aproximadamente 1 año y aproximadamente 12 años de edad. En algunas realizaciones, un niño está entre las edades de aproximadamente 1 y 6 años de edad. En otras realizaciones, un niño está entre las edades de aproximadamente 7 y 12 años de edad.

- 10 Según se usa aquí, el término “preparado para lactantes” significa una composición que satisface los requerimientos de nutrientes de un bebé, siendo un sustituto de la leche humana.

De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto un nuevo producto y un método para usar un probiótico. El producto y el método comprenden la utilización de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un probiótico inactivado, y su administración a un sujeto. En algunas realizaciones el sujeto es un bebé.

- 15 Los intentos previos de administrar de forma efectiva probióticos inactivados han encontrado obstáculos sustanciales. Por ejemplo, Kirjavainen, P., *et al.*, describieron que en una comparación de LGG viables e inactivados por calor, cerca del 40% de los niños complementados con LGG inactivado experimentaban diarrea grave. *Probiotic Bacteria in the Management of Atopic Disease: Underscoring the Importance of Viability*, J. Ped. Gastro. 36: 223-227 (2003). No se describieron reacciones adversas en el placebo o en el grupo con LGG viable. *Id.* a 225. Debido a que la diarrea está ampliamente asociada con la inflamación, el estudio de Kirjavainen indica que LGG inactivado puede causar realmente inflamación gastrointestinal. De hecho, las notas del estudio, “el proceso de inactivación por calor puede causar desnaturalización de péptidos superficiales y expresión de la proteína de choque térmico, modificando por tanto las propiedades inmunoestimuladoras de LGG de tal forma que la forma inactivada por calor induciría respuestas inflamatorias y, consecuentemente, incrementaría la permeabilidad del intestino”. *Id.* a 226. Como contraste, los presentes inventores han desarrollado un nuevo método para tratar o evitar las inflamaciones a través de la administración de al menos un probiótico inactivado, por medio de la ingestión de un producto que contiene tal o tales probióticos inactivados.
- 20
- 25

- Los presentes inventores han descubierto que se puede utilizar un probiótico inactivado para lograr efectos iguales o similares en un ser humano que los ingiere, dado que dicho ser humano obtendría el mismo probiótico vivo o viable ingiriéndolo. Aparte de las propiedades reproductivas y de actividad estrictamente asociadas con un organismo vivo, los probióticos inactivados de la presente invención mantienen las propiedades celulares y moleculares e inducen las mismas o similares respuestas reactivas biológicas en el cuerpo del hospedador que los ingieren. Como tal, el probiótico inactivado de la invención puede ser cualquier probiótico o combinación de cualquier probiótico conocido en la técnica.
- 30

- 35 En otras realizaciones, el probiótico inactivado puede ser un miembro del género *Lactobacillus*. Por ejemplo, el probiótico inactivado puede ser *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. bulgaricus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. gallinarum*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. johnsonii*, *L. leichmannii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, or *L. salivarius*. En ciertas realizaciones, el probiótico inactivado puede ser *L. acidophilus* LA-5®, *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* AS-1, *L. acidophilus* DDS-1, *L. acidophilus* HP10, *L. acidophilus* HP100, *L. acidophilus* HP101, *L. acidophilus* HP102, *L. acidophilus* HP103, *L. acidophilus* HP104, *L. acidophilus* HP15, *L. acidophilus* PIM703, *L. acidophilus* SBT2062, *L. casei* DN-114 001, *L. casei* LC10, *L. casei* PIM61, *L. casei* 431(R) (CRL431), *L. casei* F19, *L. casei* Shirota, *L. casei* immunitas, *L. crispatus* BG2FO4, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 2038, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* MR120, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* PIM695, *L. plantarum* 299V, *L. reuteri* 1063-S, *L. reuteri* 11284, *L. reuteri* SD2112, *L. reuteri* T-1, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. reuteri* SD2112, *L. reuteri* RC-14®, *L. rhamnosus* GG (LGG) ATCC 53013, *L. rhamnosus* GR-1®, *L. rhamnosus* LB21, *L. rhamnosus* R-011, *L. rhamnosus* R-049, *L. rhamnosus* MX1, *L. gasseri* ADH, *L. helveticus* MR220, *L. helveticus* NCK388, *L. johnsonii* 11088 (NCK 088), *L. johnsonii* La-1, *L. salivarius* UCC500, *L. salivarius* UCC118, or *L. lactis* San.
- 40
- 45

- Según se mostró anteriormente, en una realización particular de la invención, el probiótico inactivado puede ser LGG. LGG es una cepa probiótica aislada de la flora intestinal humana sana. Se describió en la patente de EE.UU. N° 5.032.399 de Gorbach *et al.* LGG es resistente a la mayoría de los antibióticos, estable en presencia de ácidos y bilis, y se une con avidéz a las células mucosas del tracto intestinal humano. Sobrevive durante 1-3 días en la mayoría de los individuos, y hasta 7 días en el 30% de los sujetos. Además de su capacidad de colonización, LGG también afecta beneficiosamente a las respuestas inmunológicas de la mucosa. LGG está depositado con la autoridad depositaria American Type-Culture Collection bajo n° de acceso ATCC 53103.
- 50
- 55

En otras realizaciones adicionales, el probiótico inactivado puede ser un miembro del género *Bifidobacterium*. Por ejemplo, el probiótico inactivado puede ser *B. animalis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. suis*, or *B. longum*. En

algunas realizaciones, el probiótico inactivado puede ser *Bifidobacterium animalis ssp. animalis*, *B. animalis* DN-173 010, *B. animalis ssp. lactis* (BB-12(R)), *B. breve* Yakult, *B. breve* R-070, *B. infantis* BBI, *B. infantis* 35624, *B. lactis* HN019 (DR10), *B. longum* BB46, *B. longum* BBL, or *B. longum* BB536.

5 Según se ha indicado, el probiótico inactivado puede ser *B. animalis ssp. lactis* (BB-12®), disponible de Chr. Hansen Biosystems, localizado en Milwaukee, Wis. BB-12® es una bacteria en forma de bastón, anaeróbica, Gram-positiva, que se puede encontrar en los intestinos gruesos de la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos.

10 En otras realizaciones, el probiótico inactivado puede ser *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus coagulans*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus sanguis*, o *Streptococcus thermophilus*. En una realización particular, el probiótico inactivado puede ser *E. coli* Nissle 1917. En otra realización, el probiótico inactivado puede ser *Saccharomyces cerevisiae* (*boulardii*) Iyo. En otra realización adicional, el probiótico inactivado puede ser *Lactococcus lactis* L1A. En otra realización adicional, el probiótico inactivado puede ser *S. thermophilus* TH-4™.

15 En una realización de la invención, se puede usar más de un probiótico inactivado. En esta realización se contempla cualquier combinación de probióticos inactivados, a condición de que la combinación logre el resultado pretendido. En una realización particular, una combinación puede comprender uno o más miembros del género *Bifidobacterium* y uno o más miembros del género *Lactobacillus*, por ejemplo, se pueden utilizar BB-12® y LGG. En una realización separada, se puede utilizar una combinación de BB-12® y LA-5®.

20 En el método de la descripción, una cantidad terapéuticamente efectiva de probiótico inactivado es una cantidad suficiente para reducir o evitar la inflamación sistémica en un sujeto. Esta cantidad puede corresponder a entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^{12}$  equivalentes de células por kg de peso corporal por día. En otra posibilidad, el presente método comprende la administración de entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^9$  equivalentes de células por kg de peso corporal por día. En otra posibilidad adicional, el presente método comprende la administración de aproximadamente  $1 \times 10^9$  células equivalentes por kg de peso corporal por día. En otra posibilidad adicional, el presente método comprende la administración de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  equivalentes por kg de peso corporal por día.

25 En la presente invención, se utiliza al menos un probiótico que se ha inactivado. La inactivación puede producirse mediante cualquier método actualmente conocido en la técnica o que se vaya a desarrollar. La inactivación se puede lograr, por ejemplo, a través de tratamiento térmico, liofilización, luz ultravioleta, radiación gamma, presión, disgregación química o disgregación mecánica. Por ejemplo, el probiótico puede inactivarse con tratamiento térmico a través de almacenamiento entre 80°C y 100°C durante 10 minutos. El probiótico puede inactivarse también con luz ultravioleta mediante irradiación durante 5 minutos a una distancia de 5 cm de una lámpara de UVC de 30 vatios. Alternativamente, el probiótico se puede inactivar con radiación gamma a través de irradiación de 2kg-Gray (kGy), usando una fuente de Cobalto-60 a una distancia de 20 cm.

30 La forma de administración del probiótico inactivado no es crítica, siempre que se administre la cantidad terapéuticamente efectiva. En algunos casos, el, al menos un, probiótico inactivado se administra a un sujeto mediante pastillas, píldoras, encapsulaciones, comprimidos, cápsulas de gel, cápsulas, gotas de aceite, o sobres monodosis. En otra realización, el probiótico inactivado se encapsula en un azúcar, grasa o polisacárido. En otra opción, el probiótico inactivado se añade a una comida o producto bebible y se consume. El producto alimenticio o bebible puede ser un producto nutritivo para niños como una fórmula de continuación, leche de crecimiento, bebida, leche, yogur, zumo de frutas, bebida a base de frutas, comprimido masticable, galleta, galleta salada o una leche en polvo. En otras posibilidades, el producto puede ser un producto nutritivo para bebés, como un preparado para lactantes o un fortificante de leche humana.

35 Si el, al menos un, probiótico inactivado se administra a través de un preparado para lactantes, el preparado puede ser nutricionalmente completo y contener tipos y cantidades adecuadas de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. La cantidad de lípido o grasa puede variar típicamente de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 g/100 kcal. Las fuentes de lípidos puede ser cualquiera conocida o usada en el estado de la técnica, p.ej., aceites vegetales como aceite de palma, aceite de soja, oleína de palma, aceite de coco, aceite de triglicéridos de cadena media, aceite oleico de girasol de cadena larga, aceite oleico de cártamo de cadena larga, y similares. La cantidad de proteína puede variar típicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 g/100 kcal. Las fuentes de proteína pueden ser cualquiera conocida o usada en el estado de la técnica, p.ej., leche no grasa, proteína sérica, caseína, proteína de soja, proteína hidrolizada, aminoácidos, y similares. La cantidad de carbohidrato puede variar típicamente de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 g/100 kcal. Las fuentes de carbohidrato pueden ser cualquiera conocida o usada en el estado de la técnica, p.ej., lactosa, glucosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón, sólidos de jarabe de arroz, y similares.

55 Convenientemente, se pueden usar preparados para lactantes disponibles en el comercio. Por ejemplo, Enfamil®, Enfamil®Premature Formula, Enfamil® with Iron, Lactofree®, Nutramigen®, Pregestimil®, and ProSobee® (available from Mead Johnson & Company, Evansville, Ind., EE.UU.) se pueden complementar con concentraciones adecuadas de probióticos inactivados y usados en la práctica de la invención.



En una realización de la invención, el, al menos un, probiótico inactivado puede combinarse con uno o más probióticos viables para tratar o evitar la inflamación sistémica en bebés alimentados con preparados para lactantes. Cualquier probiótico viable conocido en la técnica puede ser aceptable en esta realización, a condición de que se logre el resultado pretendido. En una realización particular, el probiótico viable se puede seleccionar de cualquiera de los géneros o especies de probióticos aquí descritos.

Si se administra un probiótico viable en combinación con el probiótico inactivado, la cantidad de probiótico viable puede corresponder a entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias (cfu) por kg de peso corporal por día. En otra realización, los probióticos viables pueden comprender entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^9$  cfu por kg de peso corporal por día. En otra realización adicional, los probióticos viables pueden comprender aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  cfu por kg de peso corporal por día.

En otra realización de la invención, el, al menos un, probiótico inactivado se puede combinar con uno o más prebióticos para tratar o evitar la inflamación sistémica o respiratoria en bebés alimentados con preparados para lactantes. Cualquier prebiótico conocido en el estado de la técnica será aceptable en esta realización, a condición de que logre el resultado deseado. Los prebióticos útiles en la presente invención pueden incluir lactulosa, gluco-oligosacárido, inulina, polidextrosa, galacto-oligosacárido, fructo-oligosacárido, isomalto-oligosacárido, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, xilo-oligosacárido, y gentio-oligosacáridos.

En otra realización adicional de la presente invención, el preparado para lactantes puede contener otras sustancias activas como LCPUFAs. LCPUFAs adecuados incluyen, pero no están limitados a, ácido  $\alpha$ -linoleico, ácido  $\gamma$ -linoleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosapentanoico (EPA), ARA y/o DHA. En una realización, se administra un probiótico inactivado en combinación con DHA. En otra realización, se administra un probiótico inactivado en combinación con ARA. En otra realización adicional, se administra un probiótico inactivado en combinación con DHA y ARA. Un preparado para lactantes comercialmente disponible que contenga DHA, ARA o una combinación de los mismos, se puede complementar con al menos un probiótico inactivado y usarse en la presente invención. Por ejemplo, Enfamil® LIPIL®, que contiene concentraciones efectivas de DHA y ARA, está disponible comercialmente y se puede complementar con al menos un probiótico inactivado y utilizarse en la presente invención.

En una realización, tanto DHA como ARA se usan en combinación con al menos un probiótico inactivado para tratar la inflamación sistémica en bebés. En esta realización, la proporción en peso de ARA:DHA es típicamente de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 9:1. En una realización de la presente invención, esta proporción es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 4:1. En otra realización adicional, la proporción es de aproximadamente 2:3 a aproximadamente 2:1. En una realización particular, la proporción es aproximadamente 2:1. En otra realización particular, la proporción es aproximadamente 1:1,5. En otras realizaciones, la proporción es aproximadamente 1:1,3. En otras realizaciones adicionales, la proporción es aproximadamente 1:1,9. En una realización particular, la proporción es aproximadamente 1,5:1. En otra realización adicional, la proporción es aproximadamente 1,47:1.

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

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

En realizaciones de la invención, la concentración de ARA está entre 0,0% y 0,67% de ácidos grasos, en peso. En otra realización, la concentración de ARA puede ser aproximadamente 0,67% en peso. En otra realización, la concentración de ARA puede ser aproximadamente 0,5% en peso. En otra realización, la concentración de DHA puede estar entre aproximadamente 0,47% y 0,48% en peso.

Si se incluye, la cantidad efectiva de DHA en una realización de la presente invención es típicamente de aproximadamente 3 mg por kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 150 mg por kg de peso corporal por día. En una realización de la invención, la cantidad es de aproximadamente 6 mg por kg de peso corporal por día, hasta aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal por día. En otra realización la cantidad es de aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 60 mg por kg de peso corporal por día. En otra realización la cantidad es de aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal por día.

Si se incluye, la cantidad efectiva de ARA en una realización de la presente invención es típicamente de aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 150 mg por kg de peso corporal por día. En una realización de la presente invención, la cantidad varía de aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 120 mg por kg de peso corporal por día. En otra realización de la presente invención, la cantidad varía de aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 90 mg por kg de peso corporal por día. En otra realización adicional, la cantidad varía de aproximadamente 20 mg por

kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 60 mg por kg de peso corporal por día.

5 Si se utiliza un preparado para lactantes, la cantidad de DHA en el preparado para lactantes puede variar de aproximadamente 5 mg/100 kcal hasta aproximadamente 80 mg/100 kcal. En una realización de la presente invención, DHA varía de aproximadamente 10 mg/100 kcal hasta aproximadamente 50 mg/100 kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de DHA es de aproximadamente 17 mg/100 kcal.

10 Si se utiliza un preparado para lactantes para bebés, la cantidad de ARA en el preparado para lactantes puede variar de aproximadamente 10 mg/100 kcal hasta aproximadamente 100 mg/100 kcal. En una realización de la presente invención la cantidad de ARA varía de aproximadamente 15 mg/100 kcal hasta aproximadamente 70 mg/100 kcal. En otra realización, la cantidad de ARA varía de aproximadamente 20 mg/100 kcal hasta aproximadamente 40 mg/100 kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de ARA es aproximadamente de 34 mg/100 kcal.

15 Si se usa un preparado para lactantes, el preparado para lactantes se puede complementar con aceites que contienen DHA y ARA, usando técnicas estándar conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden añadir DHA y ARA a la fórmula, reemplazando una cantidad equivalente de un aceite, como aceite de girasol oleico de cadena larga, normalmente presente en el preparado para lactantes. Como otro ejemplo, los aceites que contienen DHA y ARA se pueden añadir al preparado para lactantes, reemplazando una cantidad equivalente del resto de la mezcla de grasas presente normalmente en el preparado para lactantes sin DHA y ARA.

20 Si se utiliza, la fuente de DHA y ARA puede ser cualquier fuente conocida en la técnica, como aceite marino, aceite de pescado, aceite de organismos unicelulares, lípido de yema de huevo, lípido cerebral y similares. En algunas realizaciones, el DHA y ARA se extraen del aceite Martek de organismo unicelular, DHASCO® o variaciones del mismo. El DHA y ARA pueden estar en forma natural, a condición de que el resto de la fuente de LCPUFA no produzca ningún efecto deletéreo sustancial en el bebé. Alternativamente, el DHA y ARA se pueden usar en forma refinada.

25 En una realización de la presente invención, fuentes de DHA y ARA son aceites de organismos unicelulares, según se muestra en las patentes de EE.UU. N° 5.374.567; 5.550.156; y 5.397.591. Sin embargo, la presente invención no se limita sólo a tales aceites.

30 En una realización, una fuente de LCPUFA que contiene EPA se usa en combinación con al menos un probiótico inactivado. En otra realización, una fuente de LCPUFA que está sustancialmente exenta de EPA se usa en combinación con al menos un probiótico inactivado. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, un preparado para lactantes que contiene menos de aproximadamente 16 mg de EPA/100 kcal se complementa con al menos un probiótico inactivado y se usa en el método de la presente invención. En otra realización, un preparado para lactantes que contiene menos de aproximadamente 10 mg de EPA/100 kcal se complementa con al menos un probiótico inactivado y se usa en el método de la presente invención. En otra realización adicional, un preparado para lactantes que contiene menos de aproximadamente 5 mg de EPA/100 kcal se complementa con al menos un probiótico inactivado y se usa en el método de la presente invención. Otra realización de la invención incluye un preparado para lactantes para bebés que complementada con al menos un probiótico inactivado que está exento incluso de cantidades traza de EPA.

40 Se cree que la provisión de una combinación de al menos un probiótico inactivado con DHA y/o ARA, proporciona efectos complementarios o sinérgicos en relación con las propiedades antiinflamatorias de los preparados para lactantes que contienen estas sustancias. Sin querer ceñirse a esta o cualquier otra teoría, se cree que los probióticos inactivados producen efectos antiinflamatorios, en parte evitando la ubiquitinación de kB inhibidora (IkB). En una célula normal, IkB se une al factor nuclear Kb (NFkB) en el citoplasma. Cuando se produce la ubiquitinación de IkB, se libera NFkB, entra en el núcleo de la célula, y activa genes que son responsables de la respuesta inflamatoria. Es esta interacción específica y la alteración resultante de la expresión génica, lo que se cree que está implicado en la modulación de la inflamación. Se cree que los probióticos inactivados evitan la ubiquitinación de IkB, evitando así la liberación de NFkB y reduciendo o evitando la inflamación.

50 Como contraste, los ácidos grasos  $\omega$ -3 como DHA se cree que producen una acción antiinflamatoria alterando la producción de mediadores proinflamatorios, derivados de ácidos grasos, conocidos ampliamente como eicosanoides. Los ácidos grasos  $\omega$ -6, como ARA, que están localizados en el conjunto de fosfolípidos de las membranas celulares, se liberan durante la respuesta inflamatoria y liberan un conjunto de ARA libre. Sobre este conjunto de ARA actúan dos clases de enzimas, conocidas como lipooxigenasas y ciclooxigenasas, que producen un espectro específico de eicosanoides, incluyendo los prostanooides de la serie 2, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

55 Estos eicosanoides se sabe que tienen una plétora de acciones proinflamatorias en muchos tipos celulares y órganos. Se sabe que las dietas ricas en ácidos grasos  $\omega$ -3, como EPA y DHA, son competidoras para ácidos grasos  $\omega$ -6 en varias etapas de este proceso y, por tanto, moderan los efectos proinflamatorios de ARA. Por ejemplo, los ácidos grasos  $\omega$ -3 modulan la elongación de los ácidos grasos  $\omega$ -6 hasta ARA, la incorporación de ARA en el conjunto de fosfolípidos de la membrana celular, y la producción de eicosanoides proinflamatorios a partir de

ARA. La combinación de DHA y ARA, por tanto, proporciona acciones distintas pero complementarias, para moderar la respuesta inflamatoria en múltiples tejidos.

Además, en algunos casos, se administran probióticos viables e inactivados en combinación conjuntamente. La combinación de probióticos viables e inactivados se cree que proporciona efectos complementarios o sinérgicos en relación con las propiedades antiinflamatorias de las formulaciones que contienen estas sustancias. Aunque sin querer ceñirnos a esta o ninguna otra teoría, se cree que los probióticos viables proporcionan efectos antiinflamatorios en parte mediante la interacción con receptores específicos conocidos como receptores de tipo toll ("toll-like receptors") (TLRs) sobre la superficie de las células inmunológicas. La interacción directa o indirecta entre probióticos viables y estos receptores inicia una cascada de transducción de señales intracelulares que produce la alteración de la expresión génica en estas células diana. Es esta interacción específica y la alteración resultante en la expresión génica y otros efectos celulares, la que se cree que está implicada en la modulación de la inflamación. Por tanto, debido a que los probióticos viables e inactivados se cree que actúan a través de diferentes mecanismos, se cree que la combinación de estos componentes proporciona efectos complementarios o sinérgicos.

Además, en algunos casos de la invención, se administran en combinación al menos un probiótico inactivado y al menos un LCPUFA. Debido a que los probióticos viables, probióticos inactivados y LCPUFAs se cree que cada uno actúa a través de diferentes mecanismos, se cree que la combinación de estos componentes proporciona efectos complementarios o sinérgicos en relación con las propiedades antiinflamatorias de las formulaciones que contienen estas sustancias.

El sujeto necesita tratamiento, reducción o prevención de la inflamación sistémica. El sujeto puede presentar riesgo de inflamación sistémica debido a la predisposición genética, dieta, estilo de vida, enfermedades, alteraciones, y similares. Por ejemplo, un bebé pretérmino o inmunosuprimido puede presentar riesgo de inflamación sistémica y puede, por tanto, necesitar tal tratamiento, reducción o prevención.

El probiótico inactivado se administra a un bebé para prevenir, tratar o reducir la inflamación sistémica. En una realización, el bebé puede tener menos de un año de edad.

En una realización de la presente invención, el sujeto es un bebé alimentado con preparados para lactantes. En una realización, el bebé es alimentado con preparados para lactantes desde su nacimiento. En otra realización, el bebé es amamantado desde su nacimiento hasta una edad, que es inferior a un año, y a partir de entonces es alimentado con preparados para lactantes, momento en el que comienza la complementación con probiótico inactivado.

En una opción particular, el método comprende el tratamiento o prevención de la inflamación sistémica en un bebé pretérmino alimentado con preparados para lactantes. En este método, el probiótico inactivado puede administrarse al bebé pretérmino en forma de un preparado para lactantes, fortificante de leche humana, o cualquier otra forma adecuada. Adicionalmente, si se desea, el probiótico inactivado se puede administrar al bebé pretérmino en combinación con DHA, ARA, y/o uno o más probióticos viables, para crear un efecto antiinflamatorio potencialmente sinérgico.

Según la presente invención, el probiótico inactivado reduce o evita la liberación sistémica de una o más citoquinas o quimioquinas inflamatorias. Según se usa aquí, citoquinas o quimioquinas "proinflamatorias" incluye aquellas que se sabe en el estado de la técnica que están implicadas en la sobrerregulación de reacciones inflamatorias. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18 y GRO/KC.

Las quimioquinas son un grupo de citoquinas que permiten la migración de los leucocitos desde la sangre a los tejidos en el lugar de la inflamación. Cuando se producen en cantidades en exceso, las quimioquinas pueden conducir a daño del tejido sano. El oncogén relacionado con el crecimiento (GRO/KC) es una quimioquina que recluta células inmunológicas hacia el lugar de la inflamación. Es la contrapartida del quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquina de la rata, y está relacionado funcionalmente con la familia de la interleuquina-8.

Se ha demostrado que los probióticos inactivados inhiben la traslocación del factor nuclear-kB (NFkB). NFkB es un factor de transcripción primario que se encuentra en todos los tipos celulares, que se piensa que juega un papel importante en la aparición de la inflamación. En la mayoría de las células, NF-kB está presente en forma de un complejo inhibitorio, inactivo, latente, unido a kB (I $\kappa$ B) en el citoplasma. Cuando una célula recibe cualquiera de una multitud de señales extracelulares, como de citoquinas, antígenos bacterianos o radicales libres, NF-kB rápidamente entra en el núcleo y activa genes que son responsables de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que la inhibición de NFkB durante la aparición de la inflamación, produce una respuesta inflamatoria reducida. Lawrence, *et al.*, *Possible New Role for NFkB in the Resolution of Inflammation*, Nature Med. 7: 1291 (2001). Por tanto, la inhibición de NFkB a través de complementación de probiótico inactivado en la presente invención, ayuda a la reducción o prevención de la inflamación sistémica.

Como se verá en los ejemplos, se ha demostrado que los probióticos inactivados reducen la inflamación sistémica en bebés alimentados con preparados para lactantes. Las concentraciones de CINC-1 y de varias citoquinas en las crías de ratas alimentadas con preparados para lactantes, se redujeron a concentraciones similares a las de otras crías de ratas amamantadas, cuando se los complementaba con probióticos inactivados.

Como se verá en los ejemplos, se ha demostrado que los probióticos inactivados reducen significativamente la producción de IL-8, reducen la translocación de NF- $\kappa$ B, e incrementan la producción de I $\kappa$ B en el epitelio intestinal. Los inventores han descubierto, sorprendentemente, que los probióticos inactivados evitan, adicionalmente, la ubiquitinación de I $\kappa$ B, mientras que los probióticos viables no. Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

5 Otras realizaciones incluidas en el alcance de las reivindicaciones aquí descritas, serán obvias para el experto en la materia, tomando en consideración la memoria o práctica de la invención según se describe aquí.

Se pretende que la memoria, junto con los ejemplos, sea considerada sólo a modo de ejemplo, estando indicado el alcance y sentido de la invención por las reivindicaciones que siguen a los ejemplos. En los ejemplos, todos los porcentajes se basan en el peso, a menos que se indique otra cosa.

## 10 Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra el efecto de la complementación con probiótico inactivado sobre la inflamación sistémica en crías de rata neonatales alimentadas con preparados para lactantes. En este ejemplo se usó LGG como probiótico.

### Materiales y métodos

En dos experimentos separados, se asignaron crías de rata Sprague-Dawley (Taconic, Germantown, NY) aleatoriamente a cuatro grupos de alimentación de gastrostomía con cinco ratas por grupo: un grupo de control (no LPS o LGG), un grupo LPS, un grupo LPS más LGG viable, y un grupo LPS más LGG inactivado. Ratas criadas por su madre de la misma edad se usaron como controles de referencia. La alimentación por gastrostomía, usando el modelo "pup-in-the-cup" de cría de rata, comenzó en el día 7 de vida de las crías de rata. Los tubos de alimentación de gastrostomía se construyeron de secciones de 24 cm de intubación de polietileno, que se insertaron en los estómagos de las crías. La colocación de la gastrostomía se realizó bajo anestesia de isoflurano. Se conectaron bombas de jeringa controladas por un temporizador a los tubos de alimentación y se fijaron para alimentar las ratas durante los primeros 20 minutos de cada hora a una velocidad de flujo dependiente del peso.

Durante un período de aclimatación de 2 días, las crías de rata alimentadas por gastrostomía fueron alimentadas con un sustituto de leche de rata (RMS). Tras el período de aclimatación, a uno de los grupos alimentados con RMS se le suministró un complemento de  $1 \times 10^8$  equivalentes de células por kg de peso corporal por día de LGG inactivado. El LGG se inactivó a través de tratamiento térmico letal. A un segundo grupo se le proporcionó un complemento de  $1 \times 10^8$  cfu/l por kg de peso corporal por día de LGG viable. Al tercer grupo se le suministró RMS sin complementación de LGG de ningún tipo. Estas alimentaciones continuaron durante 6 días. Todos los grupos alimentados por gastrostomía recibieron la misma cantidad de grasa y carbohidratos, y el componente de proteína fue similar a la cantidad requerida para el crecimiento normal. Se usaron como controles de referencia ratas criadas con su madre de la misma edad.

Se disolvió lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 0127:B8 (LPS; Sigma, St. Louis, MO) en agua, realizando un movimiento vorticial a una concentración de 2 mg/ml. A las ratas alimentadas por gastrostomía se les dieron entre 0,25 y 0,5 mg/kg/día de LPS a través del tubo de gastrostomía, empezando 2 días después de la iniciación de la alimentación artificial. A las crías se les dio complementación con LPS durante 6 días. Esta dosis se determinó en estudios piloto, produciendo tirtonas, erección del pelo, y escasa ganancia de peso pero no se asoció con un incremento sustancial en la mortalidad durante un período de 6 días.

Al final del período de tratamiento de 6 días, las crías de rata se eutanizaron con una sobredosis de pentobarbital sódico. Se eliminó el intestino delgado y se separó en tres partes: el íleo, yeyuno y duodeno, almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ensayos enzimáticos y ELISA, o se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% para analizar la morfología intestinal. Los pulmones, hígado y plasma se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ensayos enzimáticos y ELISA.

Se usó el software estadístico Sigmastat (SPSS, Chigaco, IL) para analizar el peso corporal, ELISA para CINC-1, y resultados de ensayos multiplex de citoquina/quimioquina. Todos los datos se proporcionaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD). Se usó un análisis de varianza de una vía entre grupos (ANOVA) para determinar si había una diferencia significativa entre todos los grupos de tratamiento. Se usó el método de Holm-Sidak para comparaciones por parejas, cuando el ANOVA era significativo a  $p < 0,05$ .

### Resultados y discusión

#### Crecimiento

Este ejemplo ilustra el efecto de la administración de probiótico sobre el crecimiento de las crías tras alimentación por gastrostomía. Las crías de rata se pesaron diariamente después de la alimentación por gastrostomía, y se compararon con los animales de referencia alimentados por su madre. Los animales alimentados por su madre crecieron más rápidamente que las crías alimentadas por gastrostomía, tratadas con LPS. El suministro de probióticos viables o inactivados a las crías tratadas con LPS, alimentadas por gastrostomía, no incrementó la ganancia de peso.

CINC-1

Los probióticos viables e inactivados redujeron las concentraciones de CINC-1 en la presente invención. Las concentraciones de CINC-1 se determinaron mediante kits de ensayo inmunométricos enzimáticos TiterZyme para el oncogén de rata relacionado con el crecimiento CINC-1 (Assay Designs, Ann Arbor, MI). Se aislaron muestras de tejidos de extractos celulares de tejidos completos en el hígado, intestino, plasma y pulmón.

- 5 De determinó la absorbancia a 450 nm, y se calculó la concentración usando la ecuación derivada de una curva estándar lineal.

Según se muestra en Figuras 1 a 3, los resultados de ELISA mostraron que LPS incrementaba las concentraciones de CINC-1 en el hígado, pulmones y plasma. Tanto los probióticos viables como inactivados redujeron la producción de CINC-1 inducida por LPS en el hígado (Fig. 1) y plasma (Fig. 2) ( $p < 0,05$ ), y también mostraron una tendencia ( $p = 0,09$ ) en el pulmón (Fig. 3).

La Figura 1 ilustra que la complementación con probiótico viable reducía las concentraciones de CINC-1 en el hígado en aproximadamente el 50%, cuando se comparaba con el grupo LPS. El probiótico inactivado, sin embargo, reducía las concentraciones de CINC-1 en el hígado en aproximadamente 75%, cuando se comparaba con el grupo LPS. Por tanto, un probiótico inactivado tenía un efecto reductor significativamente mayor sobre las concentraciones de CINC-1 en el hígado, que los probióticos viables, indicando un efecto antiinflamatorio más potente. De forma similar, la Figura 2 ilustra que las concentraciones de CINC-1 en el plasma eran inferiores en el grupo del probiótico inactivado que en el grupo del probiótico viable. En el pulmón, tanto los probióticos viables como inactivados reducían las concentraciones de CINC-1 hasta un punto similar (Fig. 3).

GRO/KC

20 Según se muestra en las Figuras 4 y 5, el ensayo multiplex de citoquina mostró reducciones similares en las concentraciones de GRO/KC en el hígado y pulmones. El probiótico inactivado redujo las concentraciones de GRO/KC en mayor medida que los probióticos viables en el hígado, indicando un efecto antiinflamatorio más potente (Fig. 4). Tanto los probióticos viables como inactivados reducían las concentraciones de GRO/KC en una medida similar en los pulmones (Fig. 5).

25 Las concentraciones de CINC-1 y GRO/KC reducidas que se observaron en el pulmón en el presente experimento indican que el efecto antiinflamatorio de los probióticos inactivados se extiende a los órganos distales. Por tanto, el efecto antiinflamatorio de los probióticos inactivados es verdaderamente de naturaleza sistémica.

En el hígado, la complementación con probiótico inactivado redujo las concentraciones de CINC-1 hasta una concentración que fue realmente inferior a la de las crías de rata alimentadas con leche materna. En el pulmón y el plasma, los probióticos inactivados redujeron las concentraciones de CINC-1 hasta una cantidad que era muy similar a la de las crías de rata alimentadas con leche materna. Estos resultados muestran que los probióticos inactivados tienen la capacidad de reducir la inflamación sistémica en un bebé alimentado con preparados para lactantes hasta una concentración que es similar, y en algunos casos inferior, a la de un bebé alimentado con leche materna.

Citoquinas y quimioquinas

35 Los probióticos viables e inactivados también reducían las concentraciones de citoquina y quimioquina. Se adquirieron kits de esferas multiplex de LINCO Research, Inc (St. Charles, MO, USA). Las citoquinas/quimioquinas se analizaron mediante un kit que incluía: factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF), interferón- $\lambda$  (IFN- $\lambda$ ), interleuquina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-18, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), GRO/CK (CINC-1 de rata), y TNF- $\alpha$ . El ensayo multiplex se realizó según las instrucciones del fabricante. Se generaron curvas estándar para cada citoquina/quimioquina, usando las concentraciones de referencia suministradas por los fabricantes. Los datos brutos (intensidad fluorescente media) se analizaron mediante el Software MasterPlex Quantitation (MiraiBio, Inc., Alameda, CA, USA) para obtener valores de concentración.

45 Según se muestra en la Figura 6, las concentraciones de IL-1 $\beta$  en el hígado fueron significativamente mayores en crías tratadas con LPS, alimentadas por gastrostomía, que en las crías control. Tanto los probióticos viables como inactivados despuntaron significativamente la elevación de IL-1 $\beta$  inducida por LPS. De hecho, los probióticos inactivados redujeron las concentraciones de IL-1 $\beta$  en un grado mayor que la complementación con probiótico viable. Los probióticos inactivados redujeron la expresión de IL-1 $\beta$  hasta una concentración que era similar a la de las crías de control. Por tanto, esta parte del experimento ilustra adicionalmente la actividad antiinflamatoria sistémica de los probióticos inactivados.

55 En conclusión, estos resultados muestran que la complementación con probióticos inactivados reduce la inflamación sistémica. Adicionalmente, los resultados muestran que los probióticos inactivados reducen la inflamación sistémica en bebés alimentados con preparados para lactantes hasta una concentración que es similar a la de los bebés amamantados. Esto se ilustra en los resultados descritos aquí, a través de la comparación del grupo tratado con probiótico inactivado y el grupo alimentado exclusivamente con leche materna. En varios ejemplos, la administración

de probióticos inactivados produce una respuesta inflamatoria que es muy similar a la del otro grupo alimentado con leche materna.

**Ejemplo 2**

5 Este ejemplo ilustra el efecto de la complementación de probiótico inactivado sobre la inflamación en crías de rata neonatales alimentadas con preparados para lactantes. En este ejemplo, se utilizó como probiótico LGG.

Se trataron previamente células epiteliales intestinales con LGG viable o inactivado por UV a  $1 \times 10^8$  cfu/l y luego se estimularon por Flagelina 500 ng/ml. Se midió la producción de IL-8 mediante ELISA. Se midieron la IκB y IκB ubiquitinada (UbQ-IκB) mediante transferencia de Western e inmunoprecipitación. La localización de NFκB se evaluó mediante tinción de inmunofluorescencia.

10 Durante el experimento, la Flagelina indujo un incremento significativo en la producción de IL-8 células ( $p < 0,05$ ). Las células tratadas previamente con LGG viable o LGG inactivado por UV y estimuladas después por Flagelina, mostraban un cambio significativo ( $p < 0,05$ ) en IL-8, translocación nuclear de NFκB, IκB y UbQ-IκB. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Las flechas que apuntan hacia arriba indican un incremento en el parámetro, mientras que las flechas que apuntan hacia abajo indican una reducción en el parámetro.

15 **Tabla 1. Cambios de expresión debidos a complementación con probiótico viable o inactivado.**

	IL-8	Translocación de NFκB	IκB	UbQ-IκB
Flagelina sola	↑	↑	↓	↑
LGG viable	↓	↓	↑	↑
LGG inactivado	↓	↓	↑	↓

20 Como se muestra en la Tabla 1, la Flagelina inducía un incremento significativo de la producción de IL-8 celular epitelial intestinal ( $p < 0,05$ ). La producción de IL-8 se regulaba por reducción significativamente en presencia tanto de LGG viable como inactivado. Además, las células estimuladas por Flagelina mostraban translocación nuclear de NFκB, que se evitaba tanto por LGG viable como inactivado. La Flagelina reducía la producción de IκB, pero este efecto se revertía por tratamiento previo, tanto con LGG viable como inactivado ( $p < 0,05$ ), mientras que LGG inactivado reducía la UbQ-IκB.

25 Este ejemplo ilustra que tanto los probióticos viables como inactivados son efectivos para reducir a producción de IL-8, una citoquina proinflamatoria, y por tanto tienen un efecto antiinflamatorio. Debido a que la Flagelina y el probiótico viable incrementaban UbQ-IκB, pero el probiótico inactivado reducía UbQ-IκB, los probióticos inactivados actúan posiblemente a través de un mecanismo que evita la ubiquitinación de IκB, mientras que los probióticos viables probablemente no. Por tanto, este ejemplo ilustra adicionalmente que los probióticos viables e inactivados actúan probablemente a través de diferentes mecanismos y pueden tener efectos sinérgicos cuando se administran conjuntamente.

30 Se ha demostrado que la presente invención reduce la inflamación en el hígado, plasma y pulmones. Debido a que la presente invención se puede usar para mejorar el estado inflamatorio, también puede evitar la aparición de infecciones o enfermedades deletéreas.

La discusión de las referencias aquí descritas pretende meramente resumir las afirmaciones realizadas por sus autores y no se admite que ninguna referencia constituya estado de la técnica previo. Los solicitantes se reservan el derecho de impugnar la precisión y pertinencia de las citadas referencias.

35 Estas y otras modificaciones y variaciones sobre la presente invención se pueden llevar a cabo por los técnicos ordinarios en la materia, sin apartarse del alcance de la presente invención, que se describe más particularmente en las reivindicaciones anexas. Además, debe entenderse que los aspectos de las diversas realizaciones se pueden intercambiar parcialmente o en su totalidad. Adicionalmente, los expertos medios en la materia se darán cuenta de que la descripción anterior se proporciona sólo a modo de ejemplo y no está destinada a limitar la invención, así  
40 descrita adicionalmente en tales reivindicaciones anexas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición nutricional para uso en el tratamiento, prevención o reducción de la inflamación sistémica en un bebé, en la que la composición nutricional comprende *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado por calor, y que está destinada a ser administrada en una cantidad efectiva para proporcionar entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^{10}$  equivalentes de células de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado por kg de peso corporal por día al bebé.
- 2.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un prebiótico.
- 3.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos otro probiótico inactivado.
- 10 4.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 3, en la que el, al menos otro, probiótico inactivado comprende una combinación de uno o más miembros del género *Lactobacillus* y uno o más miembros del género *Bifidobacterium*.
- 5.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición nutricional está destinada a administrarse en una cantidad efectiva para proporcionar entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^9$  equivalentes de células por kg de peso corporal por día al bebé.
- 15 6.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición nutricional está destinada a administrarse en una cantidad efectiva para proporcionar  $1 \times 10^9$  equivalentes de células por kg de peso corporal por día al bebé.
- 7.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un probiótico viable.
- 20 8.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 7, en la que el probiótico viable se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus rhamnosus* GB, *B. animalis* ssp. *lactis*, y sus combinaciones.
- 9.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición nutricional comprende adicionalmente al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga.
- 25 10.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 9, en la que el ácido graso poliinsaturado de cadena larga se selecciona del grupo que consiste en ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico y sus combinaciones.
- 11.- La composición nutricional para el uso de la reivindicación 1, que comprende un preparado para lactantes.
- 12.- Uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado por calor, para la fabricación de una composición nutricional para el tratamiento, prevención o reducción de la inflamación sistémica en un bebé, en el que la composición nutricional está destinada a administrarse en una cantidad efectiva para proporcionar entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^{10}$  equivalentes de células de *Lactobacillus rhamnosus* GG inactivado por kg de peso corporal por día al bebé.
- 30 13.- El uso de la reivindicación 12, en el que la composición nutricional comprende adicionalmente al menos un prebiótico.
- 14.- El uso de la reivindicación 12, en el que la composición nutricional comprende adicionalmente al menos otro probiótico inactivado.
- 35 15.- El uso de la reivindicación 14, en el que el, al menos otro, probiótico inactivado, comprende una combinación de uno o más miembros del género *Lactobacillus* y uno o más miembros del género *Bifidobacterium*.
- 16.- El uso de la reivindicación 12, en el que la composición nutricional está destinada a administrarse en una cantidad efectiva para proporcionar entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^9$  equivalentes de células por kg de peso corporal por día al bebé.
- 40 17.- El uso de la reivindicación 12, en el que la composición nutricional está destinada a administrarse en una cantidad efectiva para proporcionar  $1 \times 10^9$  equivalentes de células por kg de peso corporal por día al bebé.
- 18.- El uso de la reivindicación 12, en el que la composición nutricional comprende adicionalmente al menos un probiótico viable.
- 45 19.- El uso de la reivindicación 18, en el que el probiótico viable se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus rhamnosus* GB, *B. animalis* ssp. *lactis*, y sus combinaciones.
- 20.- El uso de la reivindicación 12, en el que la composición nutricional comprende adicionalmente al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga.

21.- El uso de la reivindicación 20, en el que el ácido graso poliinsaturado de cadena larga se selecciona del grupo que consiste en ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico y sus combinaciones.

22.- El uso de la reivindicación 20, en el que la composición nutricional comprende un preparado para lactantes.



Figura 1

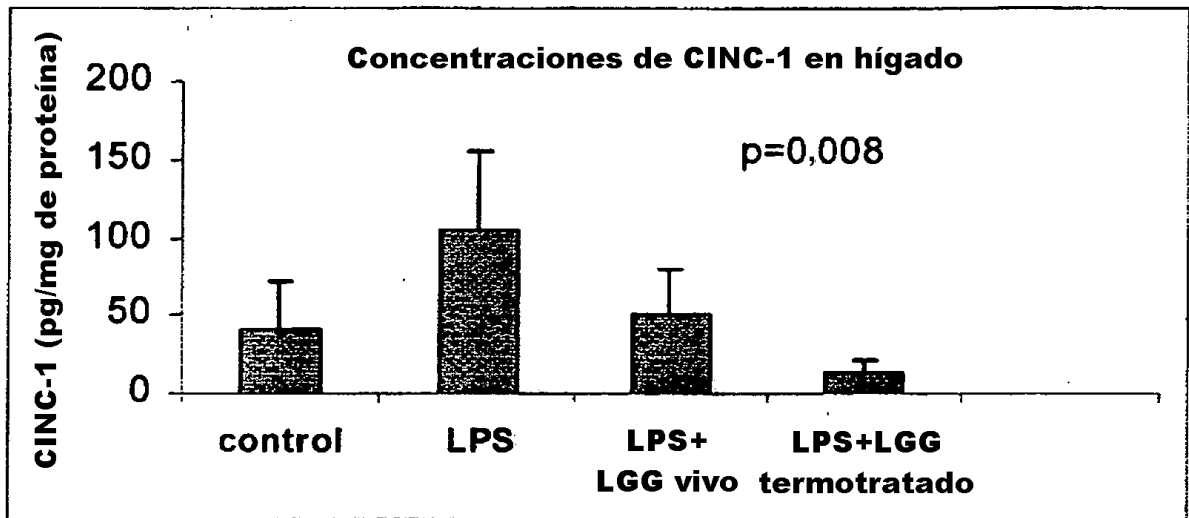


Figura 2

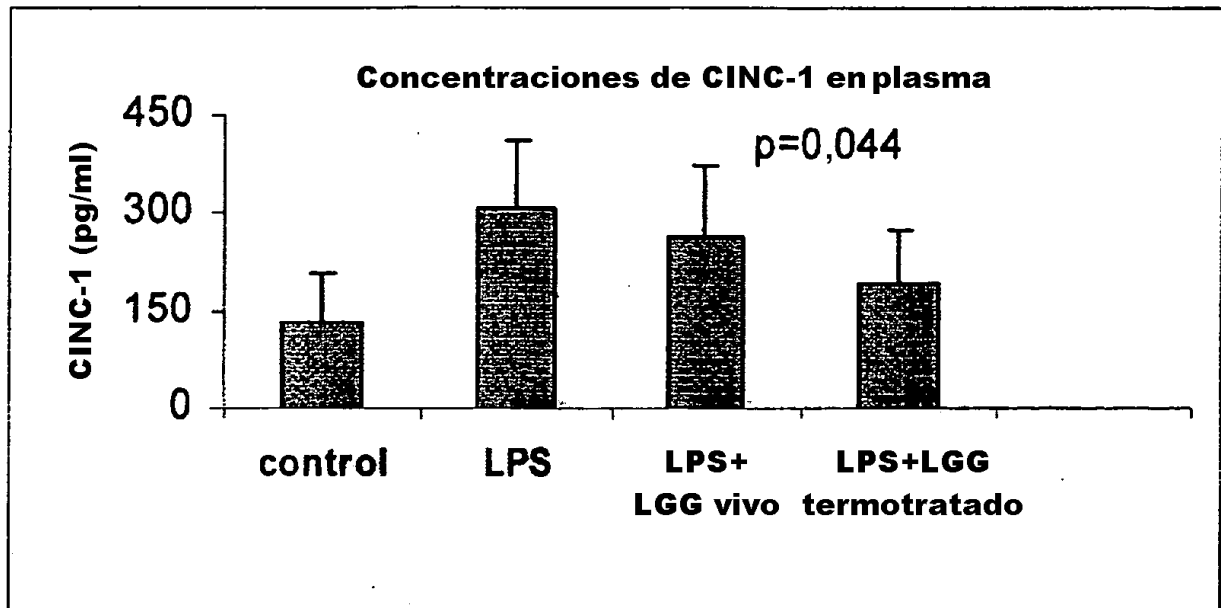


Figura 3

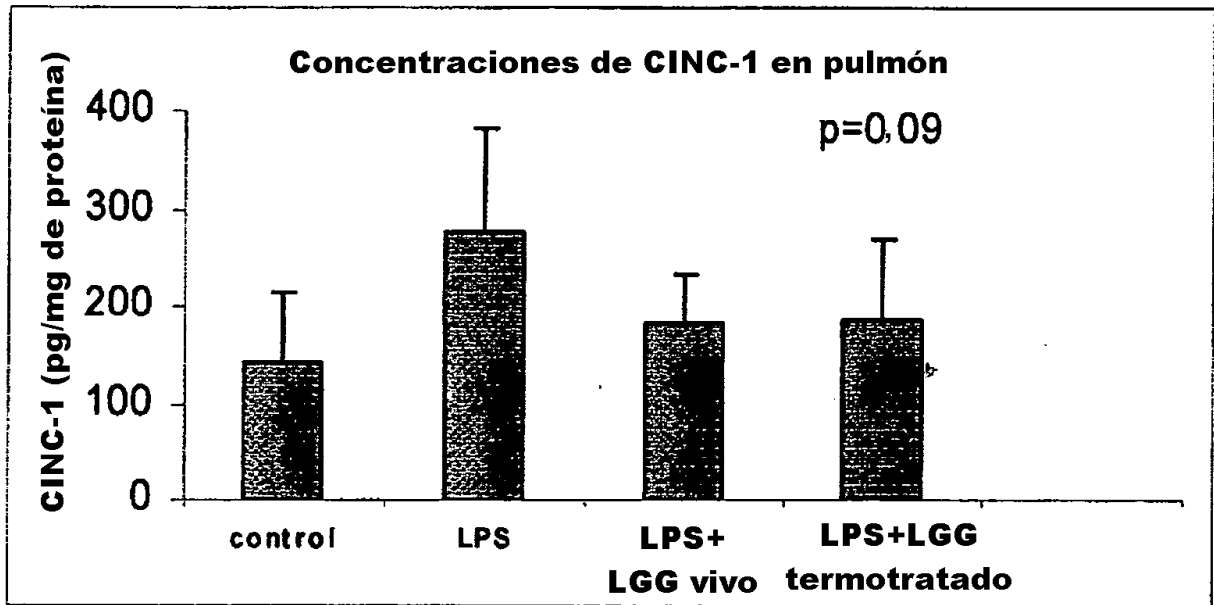


Figura 4

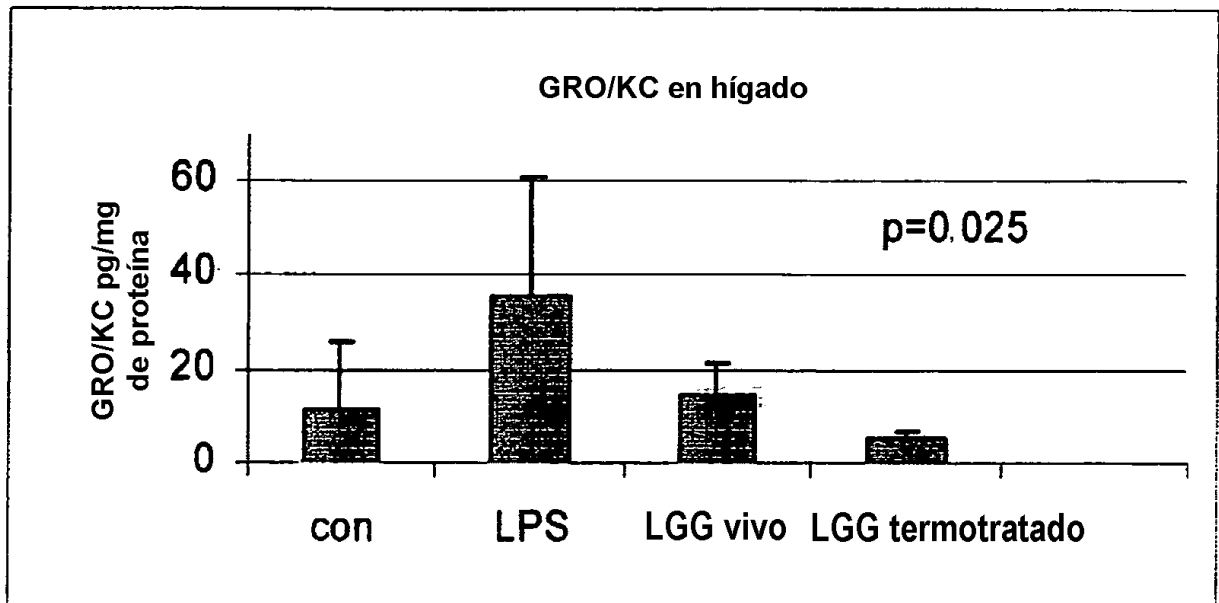


Figura 5

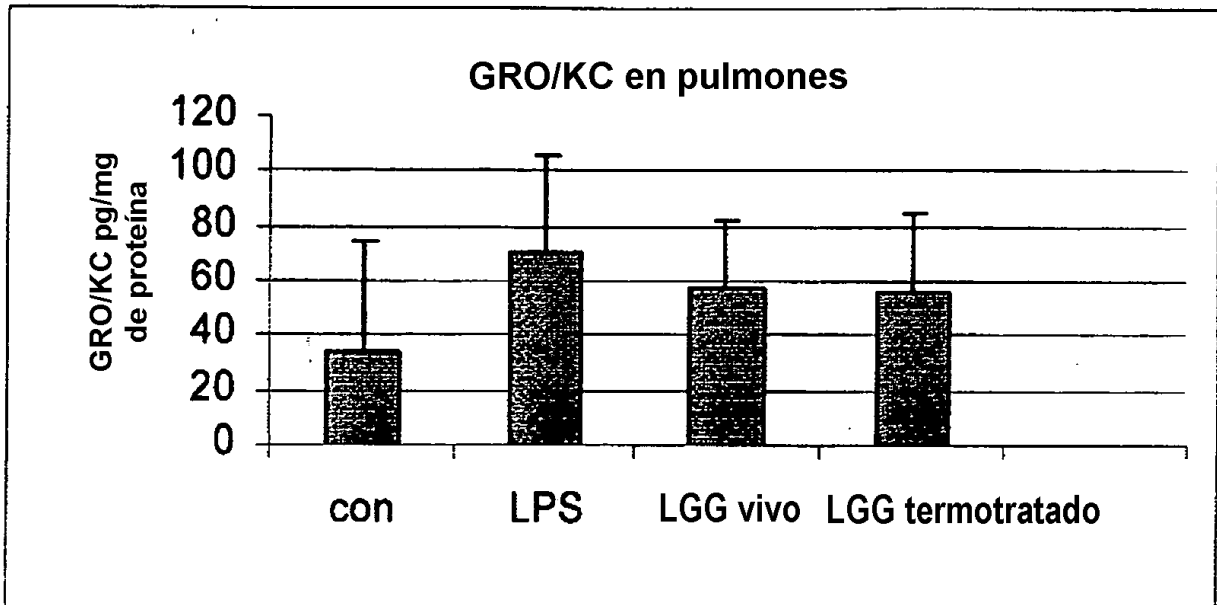


Figura 6

