

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 189**

51 Int. Cl.:

A23C 9/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2009 E 09815248 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2323493**

54 Título: **Productos probióticos infantiles**

30 Prioridad:

19.09.2008 US 284208

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

14.03.2013

73 Titular/es:

**MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY (50.0%)
2400 West Lloyd Expressway
Evansville, IN 47721-0001, US y
ALIMENTARY HEALTH LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RUSSELL, WILLIAM MICHAEL, y
CEDDIA, MICHAEL,**

74 Agente/Representante:

MOLINERO ZOFIO, Félix

ES 2 398 189 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

Productos probióticos infantiles.

Campo de la técnica

5 [0001] La presente invención se refiere generalmente a fórmulas probióticas infantiles y a productos nutricionales para niños.

Descripción de la invención

[0002] Brevemente, la presente invención está dirigida en una realización, a una fórmula infantil o producto nutricional para niños que comprende una fuente de proteínas, una fuente de lípidos, una fuente de carbohidratos, y *B. longum* AH1206.

10 [0003] En otra realización, la presente invención está dirigida a un método para reducir la inflamación en un infante o niño que comprende la administración de *B. longum* AH1206 al infante o niño.

Breve descripción de los dibujos

[0004] Para un entendimiento más completo de la presente invención, ahora se hace referencia a las siguientes descripciones asumidas de conjunto con los dibujos acompañantes.

15 [0005] La Figura 1 es un perfil de código de barras de una reacción en cadena de polímero BOX (BOX PCR) (bioanalizador) para *B. longum* AH1206. Los tamaños de los pares base se determinaron utilizando el software Agilent 2100;

[0006] La Figura 2 es un gráfico que ilustra la recuperación fecal de *B. longum* AH1206 a lo largo de un período de alimentación de 8 días y demuestra que la AH1206 puede sobrevivir en el tracto gastrointestinal del ratón;

20 [0007] La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra el efecto de *B. longum* AH1206 en la producción de citoquina interleuquina (IL)-10 por parte de células mononucleares humanas periféricas de sangre (PBMCs). Los resultados se expresan como error medio de medición estándar \pm (SEM) (n=6);

25 [0008] La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra el efecto de *B. longum* AH1206 que se alimenta del reclutamiento eosinófilo a los pulmones de ratones sensibilizados. La Figura 4A muestra que el número total de células presentes en la purga bronco alveolar (BAL) se redujo en ratones alimentados con AH1206; la Figura 4B muestra que los conteos diferenciales de células en BAL revelaron que la reducción en el número de células era fundamentalmente en la población eosinófila. (El número de células se expresa en el eje y ($\times 10^4$); *p<0,05 versus placebo);

30 [0009] Las Figuras 5A y B son gráficos que muestran el efecto de (A) la cepa bacteriana probiótica AH1206 y (B) el placebo en número total de células en fluido BAL después de examen con ovalbúmina (OVA) en animales sensibilizados (n=10/grupo, *p<0,05 en comparación con examen con OVA solamente);

35 [0010] Las Figuras 6A y B son gráficos que muestran el efecto de (A) tratamiento con *B. longum* AH1206 y (B) placebo en respuesta de vía respiratoria a la metacolina, evaluado por los cambios en la pausa enriquecida (Penh) en ratones sensibilizados con OVA después de 24 horas de examen intranasal con OVA o solución salina. Cada punto de datos representa la media \pm SEM (n=10/grupos *p<0,05 en comparación con OVA solamente);

[0011] La Figura 7 es un gráfico que muestra el nivel de citoquina del factor de necrosis de tumor (TNF) en fluido BAL de ratones sensibilizados con OVA. Cada columna representa la media \pm SEM (n=10, *p<0,05 en comparación con examen con OVA, MRS (control mediante tratamiento con caldo deMann, Rogosa and Sharpe);

40 [0012] Las Figuras 8A y B son gráficos que muestran el efecto de tratamiento oral con cepa probiótica AH1206 en producción de citoquina (A) TNF y (B) interferón (IFN)- γ a partir de esplenocitos activados aislados a partir de ratones sensibilizados con OVA (esplenocitos estimulados con CD3/CD28). Cada columna representa la media \pm SEM (n.10, *p<0,05 en comparación con examen con OVA, control mediante tratamiento con caldo MRS);

45 [0013] La Figura 9 es un gráfico que muestra que los niveles de inmunoglobulina E (IgE) específica OVA, en suero aislado a partir de ratones alimentados con AH1206 fueron significativamente inferiores con respecto a los de los respectivos controles sin alimentación AH1206 (**p= <0,01);

[0014] La Figura 10 es un gráfico que ilustra el efecto de tratamiento oral con cepa probiótica AH1206 en la producción de TNF- α de esplenocitos activados aislados a partir de ratones sensibilizados con OVA (esplenocitos estimulados con CD3/CD28).

50 [0015] La Figura 11 es un gráfico que ilustra que las células CD4+CD25+ de animales alimentados con AH1206 redujeron sustancialmente su proliferación (n=10 para todos los grupos excepto para el de control, en el que n=20);

[0016] Las Figuras 12A y B son gráficos que muestran el porcentaje de células en la población CD4+ que también son CD25+, evaluado mediante citometría de flujo (n=11 para el grupo no alimentado, n=20 para el grupo placebo y n=10 para el grupo alimentado con AH1206);

5 **[0017]** La Figura 13 ilustra que el porcentaje de células de CD4/CD25+ que expresan que el factor de transcripción FoxP3 esta significativamente sobre regulado en ratones libres de gérmenes que consumen AH1206 (n= 8 o 9 por grupo) (*p<0,05 v. placebo); y

[0018] La Figura 14 es un gráfico que ilustra la estabilidad de la cepa probiótica AH1206 durante tres meses.

El mejor modo de llevar a cabo la invención

10 **[0019]** Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones de la presente invención, de las que se presentan más abajo uno o más ejemplos. Cada ejemplo se brinda a manera de explicación de la presente invención, no como una limitante de la invención. De hecho, será palpable para aquellos expertos en la técnica que pueden hacerse diversas modificaciones y variaciones a la presente invención sin apartarse del alcance o espíritu de la invención. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una realización, pueden utilizarse en otra realización para aportar una realización ulterior.

15 **[0020]** Por tanto, se pretende que la presente invención abarque tales modificaciones y variaciones contenidas dentro del alcance de las reivindicaciones anexas y de sus equivalentes. Se describen en o son obvios a partir de la siguiente descripción detallada, otros objetos, características y aspectos de la presente invención. Un experto en la técnica debe entender que la presente discusión es una descripción de realizaciones ejemplarizantes solamente, y no se pretende que limite los aspectos más amplios de la presente invención.

20 **[0021]** Tal como se ha establecido anteriormente, la presente invención se refiere generalmente a fórmulas probióticas para infantes y productos nutricionales para niños. Las referencias relacionadas con fórmulas probióticas para productos nutricionales infantiles y niños pueden incluir a las patentes de los EE. UU. Nos. 7.179.460 a nombre de Dennen, *et al.*, y 5.922.375 a nombre de Luchansky, *et al.*

25 **[0022]** El problema técnico a resolver mediante la presente invención radica en proporcionar fórmulas infantiles y productos nutricionales para niños que contengan probióticos novedosos. Por tanto, en una realización, la presente invención está dirigida a una fórmula infantil o producto nutricional para niños que contiene la cepa *Bifidobacterium longum* AH1206. Se hizo un depósito de la cepa *B. longum* AH1206 en las Colecciones Nacionales de Bacterias Industriales, Marinas y de Alimentos (NCIMB), Escocia, Reino Unido, el 11 de mayo del 2006 y se le otorgó el número de acceso NCIMB 41382. El NCIMB es una Autoridad Depositaria Internacional reconocida bajo el Tratado de Budapest. La cepa es tolerante ante el ácido y la bilis y transita el tracto gastrointestinal. En una realización particular de la invención, *B. longum* AH1206 se aísla a partir de heces infantiles.

30

[0023] En otra realización, la fórmula infantil o producto nutricional para niños contiene cepa *B. longum* AH1206 o un mutante o variante de ésta. El mutante puede ser un mutante modificado genéticamente. La variante puede ser una variante de *Bifidobacterium* que ocurra naturalmente. En algunas realizaciones, la cepa puede ser un probiótico. En otras realizaciones, la cepa puede estar en forma de un cultivo biológicamente puro. En otras realizaciones, la cepa es aún una cepa aislada.

35

[0024] Como se emplea en esta memoria, los términos “mutante”, “variante” y “mutante genéticamente modificado” incluyen una cepa de Bifidobacteria cuyas propiedades genéticas y/o fenotípicas están alteradas en comparación con la cepa progenitora. Las variantes de *Bifidobacterium longum* que ocurren naturalmente incluyen las alteraciones espontáneas de propiedades objetivo aisladas selectivamente. La alteración deliberada de las propiedades de la cepa progenitora se logra mediante tecnologías de manipulación genética convencionales (in Vitro), tales como la alteración del gen y la transferencia conjugada.

40

[0025] La modificación genética incluye la introducción de secuencias de ADN exógeno y/o endógeno dentro del genoma de la cepa Bifidobacteria, por ejemplo por inserción dentro del genoma de la cepa bacteriana mediante vectores, incluyendo ADN plásmido, o bacteriófagos. Las mutaciones naturales o inducidas incluyen al menos alteraciones de base simple tales como supresión, inserción, transversión u otras modificaciones del ADN que pueden resultar en alteración de la secuencia aminoácida codificada por la secuencia de ADN.

45

[0026] Los términos “mutante”, “variante”, y “mutante genéticamente modificado” también incluyen una cepa de Bifidobacteria que ha sufrido alteraciones genéticas que se acumulan en un genoma a una velocidad que es consistente en la naturaleza para todos los microorganismos y/o alteraciones genéticas que ocurren a través de mutación espontánea y/o adquisición de genes y/o pérdida de genes que no se logran mediante manipulación (in Vitro) del genoma sino que se logran a través de la selección natural de variantes y/o de mutantes que proporcionan una ventaja selectiva para sostener la supervivencia de la bacteria cuando está expuesta a presiones medioambientales tales como a los antibióticos. Un mutante puede crearse mediante inserción deliberada (in Vitro) de genes específicos dentro del genoma los cuales no alteran fundamentalmente la funcionalidad bioquímica del organismo, pero cuyos productos pueden utilizarse para identificación o selección de la bacteria, por ejemplo resistencia antibiótica.

50

55

[0027] Una persona experta en la técnica aprecia que las cepas mutantes o variantes de *Bifidobacteria* se pueden identificar mediante análisis de homología de secuencia de ADN con la cepa progenitora. Las cepas de *Bifidobacteria* que tienen una identidad de secuencia cercana a la cepa progenitora se consideran como cepas mutantes o variantes. Una cepa de *bifidobacteria* con una identidad de secuencia (homología) del 96% o más, tal como 97% o más, o 98% o más, o 99% o más con la secuencia de ADN progenitor se puede considerar como mutante o variante. La homología de secuencia se puede determinar utilizando el programa en línea del algoritmo de homología "BLAST", disponible de manera pública en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

[0028] Los mutantes de la cepa progenitora incluyen también cepas derivadas de *Bifidobacteria* que tienen al menos 85% de homología de secuencia, tal como al menos 90% de homología de secuencia, o al menos 95% de homología de secuencia a la secuencia polinucleótida 16s-23s del espaciador intergénico de la cepa progenitora. Estos mutantes pueden comprender además mutaciones de ADN en otras secuencias de ADN en el genoma bacteriano.

[0029] En una realización de la invención, la cepa de *Bifidobacterium* está en la forma de células viables. Alternativamente, la cepa de *Bifidobacterium* puede estar en la forma de células desactivadas. El término "desactivada" significa que la actividad metabólica o capacidad reproductiva de la cepa se ha reducido o destruido. La desactivación puede ocurrir a través de cualquier método conocido actualmente en la técnica o por desarrollar. La desactivación se puede lograr, por ejemplo, vía tratamiento calórico, liofilización, luz ultravioleta, radiación gamma, presión, alteración química, alteración mecánica, o alteración del pH. Por ejemplo, el probiótico se puede desactivar con tratamiento calórico vía almacenamiento en el intervalo de 80°C a 100°C durante 10 minutos. El probiótico también se puede desactivar con luz ultravioleta vía irradiación durante 5 minutos a una distancia de 5 cm. de una lámpara de luz ultra violeta de 30 vatios. Alternativamente, el probiótico se puede desactivar con radiación gamma vía irradiación con 2kg-Gray (kGy) utilizando una fuente de cobalto 60 a una distancia de 20 cm. Tal como se emplea en esta memoria, el término "desactivado" es sinónimo de "no-viable".

[0030] En una realización, la cepa *B. longum* AH1206 se puede suplementar en una formulación para niños o infantes. El término "infante" significa un humano postnatal que tiene menos de un año de edad. El término "niño" significa un humano en el intervalo de 1 a 12 años de edad. En ciertas realizaciones, un niño está en el intervalo de edad de 1 a 6 años. En otras realizaciones, un niño está en el intervalo de edad alrededor de 7 a 12 años.

[0031] La cantidad de *B. longum* AH1206 suplementada en la formulación de la presente invención puede corresponder al intervalo de alrededor de 1×10^4 a alrededor de 1×10^{12} de unidades formadoras de colonias (cfu) por gramo de formulación. En otra realización, la cantidad suplementada en la formulación de la presente invención puede corresponder al intervalo de alrededor de 1×10^6 a alrededor de 1×10^9 cfu por gramo de formulación. En otra realización, la cantidad suplementada en la formulación de la presente invención puede corresponder al intervalo de alrededor de 1×10^9 a alrededor de 1×10^{12} cfu por gramo de formulación. En otra realización, la cantidad suplementada en la formulación de la presente invención puede corresponder al menos a alrededor de 1×10^6 cfu por gramo de formulación.

[0032] La forma de administración de *B. longum* AH1206 en la presente invención no es discriminante, siempre y cuando se administre al infante o niño una cantidad efectiva. En algunas realizaciones, *B. longum* AH1206 se administra a un niño o infante vía tabletas, píldoras, encapsulados, tabletas, tabletas en forma de gel, cápsulas, gotas, saches, líquidos, concentrados líquidos, polvos, elixires, soluciones, suspensiones, emulsiones, perlitas, grageas y combinaciones de los mismos. En otra realización, *B. longum* AH1206 se encapsula en un azúcar, grasa o polisacárido. En otra realización aún, *B. longum* AH1206 se añade a un producto alimentario o bebida y se ingiere. El producto alimentario o bebida puede ser un suplemento nutricional o un producto nutricional para niños tal como una fórmula de seguimiento, leche enriquecida, bebida, leche, yogurt, jugo de frutas, bebida a base de frutas, tableta masticable, galleta, galleta dulce o un polvo de leche.

[0033] En otras realizaciones, el producto puede ser un producto nutricional infantil, tal como una fórmula infantil o un fortificante de leche humana. Como se emplea en esta memoria, el término "fórmula infantil" significa una composición que satisfaga los requerimientos nutricionales de un infante al ser un sustituto de leche humana. El término "fortificante de leche humana" significa una composición que se puede añadir a la leche humana para enriquecer el valor nutricional de la leche humana. En algunas realizaciones, la composición es un producto acidificado (como requieren ciertas regulaciones médicas alimentarias).

[0034] El producto nutricional puede ser un producto para un infante a término, un infante pretérmino, un infante de bajo peso al nacer, o un infante de muy bajo peso al nacer. Como se emplea en esta memoria, los términos "pretérmino" o "infante pretérmino" pueden incluir infantes de bajo peso al nacer o de muy bajo peso al nacer. Los infantes de bajo peso al nacer son aquellos nacidos entre las 32 y 37 semanas de gestación o que pesan alrededor de 3,25 a 5,5 libras al nacer. Los infantes de muy bajo peso al nacer son aquellos nacidos antes de las 32 semanas de gestación o que pesan menos de 3,25 libras al nacer. Por tanto, los infantes pretérmino pueden incluir infantes nacidos antes de las 37 semanas de gestación y/o aquellos que pesan menos de alrededor de 5,5 libras al nacer.

[0035] En ciertas realizaciones, las formulaciones se pueden administrar enteralmente o parenteralmente. Como se emplea en esta memoria "enteral" significa a través o dentro del tracto gastrointestinal o digestivo y "administración

enteral” incluye alimentación oral, alimentación intragástrica, administración transpilórica o cualquiera otra introducción dentro del tracto digestivo. El término “parenteralmente” significa ingresado dentro del cuerpo o administrado en una manera que no sea a través del tracto digestivo, tal como inyección intravenosa o intramuscular.

5 **[0036]** Las formulaciones de la presente invención pueden proporcionar un sostén nutricional mínimo, parcial o total. Las composiciones pueden ser suplementos nutricionales o reemplazos de alimentos. En algunas realizaciones, las composiciones se pueden administrar de conjunto con una composición alimentaria o nutritiva. En esta realización, las composiciones pueden o entremezclarse con el alimento o composición nutritiva antes de la ingestión por el sujeto o se pueden administrar al sujeto antes o después de la ingestión de un alimento o composición nutritiva. Las composiciones se pueden administrar a infantes pretérmino que reciban fórmula infantil, leche materna, un fortificante de leche humana, o combinaciones de los mismos. Las composiciones pueden, pero no necesitan, ser completas de manera nutritiva. El término “completa de manera nutritiva” significa que la composición contiene nutrientes adecuados para sostener vida humana saludable durante períodos largos.

10 **[0037]** En algunas realizaciones, la presente invención puede comprender un suplemento prenatal dietético para ser consumido por una gestante, proporcionando por tanto *B. longum* AH1206 al feto in útero. En otras realizaciones, la presente invención puede comprender un suplemento dietético postnatal para ser consumido por una madre que amamanta, proporcionando por tanto *B. longum* AH1206 al infante postnatal vía la leche materna.

15 **[0038]** Si el *B. longum* AH1206 se administra vía una fórmula infantil o producto nutricional para niños, la formulación puede ser nutritivamente integral y contener tipos y cantidades apropiadas de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. La cantidad de lípidos o grasas típicamente puede variar de alrededor de 3 a 7 g/100 kcal. Las fuentes de lípidos pueden ser cualesquiera conocidas o utilizadas en la técnica, e. g., grasa láctea, lípido de yema de huevo, aceite de pescado, aceites vegetales tales como aceite de palma, aceite de soja, palmoleína, aceite de grano de palma, aceite de coco, aceite de triglicérido de cadena media, aceite de girasol oleico saturado, aceite de oliva, aceite de cártamo oleico saturado, y ésteres de ácidos grasos.

20 **[0039]** La cantidad de proteína puede variar típicamente de alrededor de 1 a alrededor de 5 g/100 kcal. Las fuentes de proteína pueden ser cualesquiera conocidas o utilizadas en la técnica, e. g., proteína láctea, sólidos de leche desgrasada, leche desgrasada, proteína de suero, caseína, proteína de soja, proteína animal, proteína de cereal, proteína vegetal o combinaciones de los mismos. La formulación puede contener proteínas y/o péptidos ricos en glutamina/glutamato. La fuente de proteína puede ser intacta, parcialmente hidrolizada, o extensamente hidrolizada. La fuente de proteína, en algunas realizaciones, puede ser una combinación de proteína intacta y proteína hidrolizada. La fuente de proteína puede ser un aislado o un concentrado.

25 **[0040]** En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención puede contener una fuente de nitrógeno (i. e., aminoácidos y/o proteínas) tal que la cantidad total de aminoácidos o proteínas puedan ser de alrededor de 1 g/100 kilocalorías (kcal) a alrededor de 10 g/100 kcal de la composición total, en algunas realizaciones de alrededor de 2 g/100 kcal a alrededor de 6 g/100 kcal. La cantidad de fuente de lípidos por 100 kcal de la composición total puede ser mayor de 0 g hasta alrededor de 6 g, en algunas realizaciones de alrededor de 0,5 g a alrededor de 5,5 g, y en otras realizaciones de alrededor de 2 g a alrededor de 5,5 g; y la cantidad de la fuente de carbohidratos no fibrosos por 100 kcal de la composición total puede ser de alrededor de 5 g a alrededor de 20 g, y en algunas realizaciones puede ser de alrededor de 75, g a alrededor de 15 g. La cantidad de vitaminas y minerales en la composición nutritivamente completa puede ser suficiente para cumplir al 100% la ingestión diaria recomendada en los EE. UU. (RDI) de alrededor de 500 a alrededor de 3 000 kcal, en algunas realizaciones de alrededor de 1 00 a 3 000 kcal. En una realización particular, la composición puede no contener proteína. En tal realización, la composición puede contener una fuente equivalente de proteína que comprenda el 100% de aminoácidos libres.

30 **[0041]** La cantidad de carbohidratos puede variar típicamente de alrededor de 8 a alrededor de 12 g/100 kcal. Las fuentes de carbohidratos pueden ser cualesquiera conocidas o utilizadas en la técnica, e. g., lactosa, fructosa, glucosa, sirope de maíz, sólidos de sirope de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón, sólidos de sirope de arroz, almidón de arroz, almidón de maíz modificado, almidón de tapioca modificado, harina de arroz, harina de soja, y combinaciones de los mismos. La formulación puede incluir uno cualquiera o más de un adyuvante, un componente bacteriano, una entidad de medicamento, o un compuesto biológico.

35 **[0042]** De manera conveniente, las fórmulas infantiles disponibles comercialmente y otras formulaciones se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. Por ejemplo, Enfamil®, Enfamil® Premature Formula, Enfamil® with Iron, Lactofree®, Nutramigen®, Pregestimil® y ProSobee® (disponible en Mead Jonson & Company, Evansville, IN, USA) se pueden suplementar con niveles apropiados de *B. longum* AH1206 y utilizar en la práctica de la presente invención.

40 **[0043]** La formulación de la presente invención puede incluir opcionalmente una o más de las siguientes vitaminas o derivados de las mismas, incluyendo pero no limitadas a, biotina, vitamina B₁, pirofosfato de tiamina, vitamina B₂, riboflavina, mononucleótido de flavina, dinucleótido de flavina adenina, hidrocloreuro de piridoxina, mononitrato de tiamina, ácido fólico, vitamina B₃, niacina, ácido nicotínico, nicotinamida, niacinamida, dinucleótido de nicotinamida adenina, triptofan, biotina, ácido pantoténico, vitamina B₆, vitamina B₁₂, cobalamina, metilcobalamina,

deoxiadenosil/cobalamina, cianocobalamina, pantotenato de calcio, ácido pantoténico, vitamina C, ácido ascórbico, vitamina A, retinol, retinal, ácido retinoico, beta caroteno, vitamina D, vitamina D₃, calciferol, colecalciferol, dihidroxi vitamina D, 1,25-dihidroxicolecalciferol, 7-dehidrocolesterol, colina, vitamina E, acetato de vitamina E, vitamina K, menadiona, menaquinona, filoquinona, naftoquinona y mezclas de las mismas.

5 **[0044]** La formulación de la presente invención puede incluir opcionalmente uno o más de los siguientes minerales o derivados de los mismos, incluyendo pero no limitado a, fósforo, sulfuro de potasio, sodio, docusato de sodio, cloruro, manganeso, magnesio, estereato de magnesio, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, hidróxido de magnesio, sulfato de magnesio, cobre, sulfato cúprico, yoduro, boro, zinc, óxido de zinc, cromo, molibdeno, hierro, hierro carbonilo, hierro férrico, fumarato ferroso, hierro polisacárido, flúor, selenio, molibdeno, fosfato o acetato de calcio, fosfato de potasio, sulfato u óxido de magnesio, cloruro de sodio, cloruro o acetato de potasio, ortofosfato férrico, acetato alfa-tocoferilo, sulfato u óxido de zinc, gluconato de cobre, cloruro o picolonato de cromo, yoduro de potasio, selenato de sodio, molibdato de sodio, filoquinona, cianocobalamina, selenita de sodio, sulfato de cobre, inositol, yoduro de potasio, cobalto y mezclas de los mismos. Los derivados no limitantes a manera de ejemplo de compuestos minerales incluyen sales, sales alcalinas, ésteres y quelados de cualquier compuesto mineral.

15 **[0045]** La composición de la presente invención puede contener también emulsionantes y estabilizadores tales como lecitina de soja, musgo de Irlanda y combinaciones de los mismos. La composición de la presente invención puede contener opcionalmente otras sustancias que pueden tener un efecto beneficioso tales como lactoferina, nucleótidos, nucleósidos, inmunoglobulinas y combinaciones de los mismos.

20 **[0046]** En una realización de la invención, *B. longum* AH1206 se puede administrar en combinación con uno o más probióticos. El término "probiótico" significa un microorganismo que ejerce efectos beneficiosos en la salud del hospedero. Cualquier probiótico conocido en la técnica puede considerarse aceptable en esta realización siempre y cuando este logre el resultado esperado. En una realización particular, el probiótico se puede seleccionar de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Bifidobacterium longum species* y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12. En una realización, el probiótico(s) adicional puede ser viable o no viable.

25 **[0047]** En otra realización de la invención, *B. longum* AH1206 se puede combinar con uno o más prebióticos. El término "prebiótico" significa un ingrediente alimentario no digerible que estimula el crecimiento y/o la actividad de probióticos. Cualquier prebiótico conocido en la técnica será aceptable en esta invención siempre y cuando logre el resultado deseado. Los prebióticos útiles en la presente invención pueden incluir oligosacáridos, polisacáridos y otros prebióticos que contengan fructosa, xilosa, soja, galactosa, glucosa o manosa. Más específicamente, los prebióticos útiles en la presente invención pueden incluir lactulosa, gluco-oligosacárido, inulina, polidextrosa, galacto-oligosacárido, fructo-oligosacárido, isomalto-oligosacárido, oligosacáridos de frijol de soja, lactosacarosa, xilo-oligosacárido, y gentio-oligosacáridos.

35 **[0048]** En aún otra realización de la presente invención, la formulación puede contener otros agentes activos tales como ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFAs). Los LCPUFAs apropiados incluyen pero no se limitan a, ácido α -linoléico, ácido γ -linoléico, ácido linoléico, ácido linolénico, ácido eicosapentanoico (EPA), ácido araquidónico (ARA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA). En una realización, *B. longum* AH1206 se administra en combinación con DHA. En otra realización, *B. longum* AH1206 se administra en combinación con ARA. En otra realización aún, *B. longum* AH1206 se administra en combinación con ambos DHA y ARA. La fórmula infantil disponible comercialmente que contiene DHA, ARA, o una combinación de los mismos se puede suplementar con *B. longum* AH1206 y utilizarse en la presente invención. Por ejemplo, el Enfamil® LIPIL® que contiene niveles efectivos de DHA y ARA, está disponible comercialmente y se puede suplementar con *B. longum* AH1206 y utilizarse en la presente invención.

45 **[0049]** En una realización, ambos DHA y ARA se administran en combinación con *B. longum* AH1206. En esta realización, la relación de peso ARA:DHA puede ser de alrededor de 1:3 a alrededor de 9:1. En una realización de la presente invención, esta relación es de alrededor de 1:2 a 4:1. En otra realización aún, la relación es de alrededor de 2:3 a alrededor de 2:1. En una realización particular la relación es de alrededor de 2:1. En otra realización particular de la invención, la relación es de alrededor de 1:1,5. En otras realizaciones, la relación es de alrededor de 1:1,3. En otras realizaciones aún, la relación es de alrededor de 1:1,9. En una realización particular, la relación es de alrededor de 1,5:1. En una realización ulterior, la relación es de alrededor de 1,47:1.

50 **[0050]** En ciertas realizaciones de la presente invención, el nivel de DHA está en el intervalo de alrededor de 0,0% a 1,00% en peso de ácidos grasos. El nivel de DHA puede ser de alrededor de 0,32% en peso. En algunas realizaciones, el nivel de DHA puede ser de alrededor de 0,33% en peso. En otra realización, el nivel de DHA puede ser de 0,64% en peso. En otra realización, el nivel de DHA puede ser de alrededor de 0,67% en peso. En otra realización aún, el nivel de DHA puede ser de alrededor de 96% en peso. En una realización posterior, el nivel de DHA puede ser de alrededor de 1,00% en peso.

55 **[0051]** En realizaciones de la presente invención, el nivel de ARA está en el intervalo de 0,0% y 0,67% en peso de ácidos grasos. En otra realización, el nivel de ARA puede ser de alrededor de 0,67% en peso. En otra realización, el nivel de ARA puede ser de alrededor de 0,5% en peso. En otra realización aún, el nivel de DHA puede estar en el intervalo alrededor de 0,47% y 0,48% en peso.

- 5 **[0052]** De estar incluido, la cantidad efectiva de DHA en una realización de la presente invención es típicamente de alrededor de 3 mg por kg de peso corporal por día a alrededor de 150 mg por kg de peso corporal por día. En una realización de la presente invención, la cantidad es de alrededor de 6 mg por kg de peso corporal por día a alrededor de 100 mg por kg de peso corporal por día. En otra realización la cantidad es de alrededor de 10 mg por kg de peso corporal por día a alrededor de 60 mg por kg de peso corporal por día. En otra realización aún la cantidad es de alrededor de 15 mg por kg de peso corporal por día a alrededor de 30 mg por kg de peso corporal por día.
- 10 **[0053]** De estar incluido, la cantidad efectiva de ARA en una realización de la presente invención es típicamente de alrededor de 5 mg por kg de peso corporal por día a alrededor de 150 mg por kg de peso corporal por día. En una realización de esta invención, la cantidad varía de alrededor de 10 mg por kg de peso corporal por día a alrededor de 120 mg por kg de peso corporal por día. En otra realización, la cantidad varía de alrededor de 15 mg por kg de peso corporal por día a alrededor de 90 mg por kg de peso corporal por día. En otra realización aún, la cantidad varía de alrededor de 20 mg por kg de peso corporal por día a alrededor de 60 mg por kg de peso corporal por día.
- 15 **[0054]** Si se utiliza una fórmula infantil, la cantidad de DHA en la fórmula infantil puede variar de alrededor de 5 mg/100 kcal a alrededor de 80 mg/100kcal. En una realización de la presente invención, el DHA varía de alrededor de 10 mg/100kcal a alrededor de 50 mg/100kcal; y en otra realización, de alrededor de 15 mg/100kcal a alrededor de 20 mg/100kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de DHA es de alrededor de 17 mg/100 kcal.
- 20 **[0055]** Si se utiliza una fórmula infantil, la cantidad de ARA en la fórmula infantil puede variar de alrededor de 10 mg/100 kcal a alrededor de 100 mg/100 kcal. En una realización de la presente invención, la cantidad de ARA varía de alrededor de 15 mg/100 kcal a alrededor de 70 mg/100 kcal. En otra realización, la cantidad de ARA varía de alrededor de 20 mg/100kcal a alrededor de 40 mg/100 kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de ARA es de alrededor de 34 mg/100kcal.
- 25 **[0056]** Si se utiliza una fórmula infantil, la fórmula infantil se puede suplementar con aceites que contengan DHA y ARA utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica. Por ejemplo, los DHA y ARA se pueden añadir a la fórmula reemplazando una cantidad equivalente de aceite, tal como aceite de girasol oleico saturado, normalmente presente en la fórmula. Como otro ejemplo, los aceites que contienen DHA y ARA se pueden añadir a la fórmula reemplazando una cantidad equivalente del resto de la mezcla total de grasas normalmente presente en la fórmula sin DHA y ARA.
- 30 **[0057]** Si se utiliza, la fuente de DHA y ARA puede ser cualquier fuente conocida en la técnica tal como aceite marino, aceite de pescado, aceite de célula única, lípido de yema de huevo y lípido cerebral. En algunas realizaciones, el DHA y ARA son extraídos del aceite Martek de célula única, DHASCO® o variaciones de los mismos. EL DHA y el ARA pueden estar en forma natural, siempre y cuando el resto de la fuente de LCPUFA no resulte en un efecto nocivo sustancial para el infante. Alternativamente, el DHA y el ARA se pueden utilizar en forma refinada.
- 35 **[0058]** En una realización de la presente invención, las fuentes de DHA y ARA son aceites de célula única como describen las Patentes de los EE. UU. Nos. 5.374.567; 5.550.156 y 5.397.591, cuyas descripciones se incorporan a esta memoria en su totalidad como referencia. Sin embargo, la presente invención no se limita solamente a tales aceites.
- 40 **[0059]** En una realización, una fuente de LCPUFA que contiene EPA se utiliza en combinación con *B. longum* AH1206. En otra realización, una fuente de LCPUFA sustancialmente libre de EPA se utiliza en combinación con *B. longum* AH1206. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, una fórmula infantil que contiene menos de alrededor de 16 mg EPA/100 kcal se suplementa con *B. longum* AH1206 y se utiliza en el método de la presente invención. En otra realización, una fórmula infantil que contiene menos de alrededor de 10 mg EPA/100 kcal se suplementa con *B. longum* AH1206 y se utiliza en el método de la presente invención. En otra realización aún, una fórmula infantil que contiene menos de alrededor de 5 mg EPA/100 kcal se suplementa con *B. longum* AH1206 y se utiliza en el método de la presente invención. Otra realización de la invención incluye una fórmula infantil suplementada con *B. longum* AH1206 que está libre aún de trazas de EPA.
- 45 **[0060]** Se apreciará que la combinación de *B. longum* AH1206 y probióticos, prebióticos, LCPUFAs u otros ingredientes activos se puede administrar en una formulación única o como formulaciones independientes administradas al mismo tiempo o diferente y utilizando la misma ruta o diferentes rutas de administración.
- 50 **[0061]** En una realización de la presente invención, la formulación se puede utilizar en protocolos de inmunización y vacunación. La inmunización oral mediante el uso de bacterias probióticas como vectores no solo protegería de la infección al anfitrión, sino que reemplazaría el estímulo inmunológico que el patógeno provocaría normalmente, contribuyendo por tanto a la educación inmunológica del anfitrión.
- 55 **[0062]** En una realización de la invención, la formulación es útil en el tratamiento, reducción y/o prevención de inflamación. Como se emplea en esta memoria, el término "tratamiento" significa mejoramiento, beneficio o remedio de una enfermedad, padecimiento o síntoma de una enfermedad o condición. El término "reducción" significa

disminución en extensión, cantidad o grado. El término “prevención” significa la detención o inhibición de una enfermedad, padecimiento o síntoma de una enfermedad o condición a través de alguna acción.

5 **[0063]** En una realización particular, la presente invención comprende el uso de *B. longum* AH1206 para la producción de una composición para reducir o prevenir la inflamación en un infante o niño. Los ejemplos 2-6 indican cada uno que la administración de *B. longum* AH1206 puede reducir o prevenir la inflamación en un infante o niño. La inflamación se puede reducir o prevenir en el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio, o se puede reducir sistémicamente. La reducción o prevención de la inflamación puede mejorar las alergias o el asma.

10 **[0064]** En esta realización, la inflamación puede ser inflamación respiratoria, tal como asma, rinitis alérgica, sinusitis, inflamación del tejido del conducto respiratorio, infección respiratoria superior, influenza, garrotillo, virus respiratorio sincitial, bronquitis, bronquiolitis, neumonía o inflamación del lumen del conducto respiratorio. De manera similar, la inflamación puede ser inflamación gastrointestinal, tal como diarrea, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, enterocolitis, colitis ulcerativa, colitis alérgica, síndrome del intestino irritable, embolsamiento, colitis post infección, diarrea asociada a *Clostridium difficile*, diarrea asociada a Rotavirus o diarrea post infectiva o enfermedad diarreaica debido a un agente infeccioso, tal como *E. coli*. En otras realizaciones, la inflamación puede ser sistémica, tal como artritis reumatoide. El término “sistémico” como se emplea en esta memoria, significa relacionado con o que afecta a todo el cuerpo.

20 **[0065]** En algunas realizaciones, la reducción o prevención de la inflamación puede mejorar o prevenir condiciones atópicas o enfermedades. Por ejemplo, la reducción o prevención de la inflamación puede mejorar o prevenir la dermatitis atópica. En una realización particular, la reducción o prevención de la inflamación puede mejorar o prevenir afecciones comunes infantiles o niños. Por ejemplo, la reducción o prevención de la inflamación puede mejorar o prevenir la diarrea o la otitis media aguda. En otra realización aún, la reducción o prevención de la inflamación puede mejorar o prevenir alergias a alimentos.

25 **[0066]** Se cree que *B. longum* AH1206 actúa al antagonizar y excluir microorganismos pro-inflamatorios del tracto gastrointestinal o lugar inflamatorio. También se cree que *B. longum* AH1206 actúa al reducir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias.

30 **[0067]** En una realización particular, la cepa puede modificar los niveles de la IL-10 en un sujeto. La IL-10 es producida por células T, células B, monocitos y macrófagos. Esta citoquina aumenta la proliferación y diferenciación de células B en células que segregan anticuerpos. La IL-10 exhibe mayormente actividades anti inflamatorias. Ella sobre regula la expresión IL-1RA mediante monocitos y suprime la mayoría de las actividades inflamatorias de monocitos. La IL-10 inhibe la producción de monocitos de las citoquinas, de mediadores reactivos de oxígeno y nitrógeno, de la expresión del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) clase II, aniquilamiento de parásitos y producción de IL-10 vía un mecanismo de retroalimentación. Esta citoquina también se ha mostrado que bloquea la producción de monocitos de colagenasa intestinal y colagenasa tipo IV al interferir con un camino operacional dependiente de monofosfato de prostaglandina cíclico-E2 de adenosina (PGE₂-cAMP) y por tanto puede ser un regulador importante de la destrucción del tejido conectivo visto en enfermedades inflamatorias crónicas. Por tanto, en una realización, la cepa puede sobre regular o inducir secreción de, los niveles de IL-10 en infantes o en niños que consumen la cepa.

40 **[0068]** En otras realizaciones, *B. longum* AH1206 subregula o disminuye la secreción de TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 y/o IFN- γ u otras citoquinas o quemokinas pro inflamatorias. La TNF- α , una citoquina pro inflamatoria, inicia una cascada de citoquinas y efectos biológicos que resultan en un estado inflamatorio. En algunas realizaciones, el porcentaje de células reguladoras T se puede incrementar con la administración de *B. longum* AH1206. En otras realizaciones, la administración de *B. longum* AH1206 inhibe la inducción de una respuesta IgE específica OVA.

45 **[0069]** En algunas realizaciones, la formulación de la presente invención es útil para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunológico. En otras realizaciones, la formulación de la presente invención es útil en el mejoramiento o enriquecimiento de la inmunidad en un sujeto.

50 **[0070]** En algunas realizaciones, el enriquecimiento de la inmunidad o supresión de la inflamación puede incluir estimulación de la integridad intestinal; reducción de la permeabilidad intestinal, mejoramiento de síntesis, secreción, y/o calidad de mucina; mejoramiento de la maduración y diferenciación del epitelio intestinal; mejoramiento de absorción de nutrientes; incremento de la producción de factores solubles que transfieren actividad microbiana; estimulación de, mejoramiento de, o sostén de la resistencia a la infección; sostén de respuestas celulares o humorales contra infección viral o bacteriana; citotoxicidad incrementada (tanto anti-viral como anti-tumoral); sostén de respuestas de vacunación sistémicas y/o de mucosas; incremento o sostén de inmunidad celular y/o humoral; incremento o sostén de inmunidad natural (incluyendo neutrófilos, fagocitos, macrófagos y actividad celular natural de exterminio); incremento o sostén de inmunidad adaptativa de células T y B; estimulación de un patrón de citoquina de un coadyuvante de célula T 1 (Th1) (IL-1, IL-2, IFN- γ , IL-12, TNF- α incrementado; expresión de antígeno-Dr (HLA-Dr) de leucocito humano); supresión de inflamación o producción de mediadores inflamatorios sistémicos y de mucosas (incluyendo citoquinas y/o quemocinas); reducción o sensibilización mediante reducción total y/o alérgico específica IgE; reducción de la producción de citoquinas alérgicas, reducción de un perfil Th2 de sostén de inmunoglobulina; y combinaciones de los mismos.

[0071] La producción de citoquinas multifuncionales a lo largo de un amplio espectro de tipos de tumores sugiere que las respuestas inflamatorias significativas son continuas en pacientes con cáncer. Por tanto, en una realización de la invención, *B. longum* AH1206 puede ser útil en el tratamiento de síntomas de cáncer. Debido a las propiedades anti inflamatorias de *B. longum* AH1206, esta cepa bacteriana puede reducir la velocidad de transformación de células malignas. Es más, las bacterias intestinales pueden producir, a partir de compuestos dietéticos, sustancias con actividad genotóxica, carcinogénica y promotora de tumores y las bacterias intestinales pueden activar procarcinógenos a agentes reactivos del ADN. En general, las especies de *Bifidobacterium* tienen bajas actividades de enzimas xenobióticas metabolizadoras en comparación con otras poblaciones dentro del intestino tales como bacteroides, eubacteria y clostridia. Por tanto, el incremento del número de bacterias *Bifidobacterium* en el intestino pudiera modificar de manera beneficiosa los niveles de estas enzimas.

[0072] En realizaciones particulares, se puede administrar *B. longum* AH1206 en combinación con terapias anti inflamatorias tales como medicamentos anti inflamatorios no esteroideos (NSAIDs) o infliximab.

[0073] La microflora intestinal del infante se establece rápidamente en las primeras semanas después del nacimiento. La naturaleza de esta colonización intestinal se determina inicialmente por exposición temprana a las fuentes medio ambientales de microbios así como a la salud del infante. Los infantes nacidos vía cesárea, pretérmino u otros infantes que viven la primera parte de sus vidas en un incubador estéril, y/o los infantes que reciben antibióticos tempranamente en la vida son susceptibles de tener demoras significativas en el desarrollo de una microflora intestinal saludable. Debido a que estos infantes no tienen la oportunidad de adquirir de sus madres o del medioambiente una microflora intestinal saludable, el consumo de *B. longum* AH1206 puede contribuir de manera beneficiosa al desarrollo apropiado y funcionamiento del sistema inmune intestinal.

[0074] En algunas realizaciones de la presente invención, el infante o niño necesita de tratamiento, reducción, o prevención de la inflamación. El sujeto puede estar en riesgo de inflamación debido a predisposición genética, dieta, estilo de vida, enfermedades o trastornos. Por ejemplo, un infante pretérmino o inmunodeprimido puede estar en riesgo de inflamación y puede, por tanto, necesitar tal tratamiento, reducción o prevención.

[0075] La composición de la presente invención se puede empaquetar en cualquier tipo de contenedor conocido en la técnica para utilizarlo en el almacenamiento de productos nutricionales tales como vidrio, cartón reforzado, plástico y potes metálicos recubiertos. En algunas realizaciones, la composición se empaqueta vía técnicas de empaque de sellado mediante soplado. En otras realizaciones, la composición se presenta en un contenedor de dosis única. El empaque de la composición se puede realizar bajo condiciones asépticas. En algunas realizaciones, la composición se prepara de manera que sea aceptable para administración directa a un infante pretérmino vía tubos nasogástricos, tubos nasoduodenales o tubos nasoyeyunales.

[0076] La composición de la presente invención puede ser de almacenamiento estable. "Almacenamiento estable" significa que la composición, en una forma lista para consumir, se mantiene en una fase homogénea única (i. e., que no se separa en más de una fase ante la inspección visual), y/o que no ocurra asentamiento ante la inspección visual después del almacenamiento durante la noche en el refrigerador.

[0077] Los siguientes ejemplos describen diversas realizaciones de la presente invención. Otras realizaciones dentro del alcance de las reclamaciones en esta memoria serán palpables al experto en la técnica al considerar la solicitud o práctica de la presente invención tal como se describe en la presente memoria. Se pretende que la solicitud, conjuntamente con los ejemplos, se considere solo a manera de ejemplo, indicando el alcance y espíritu de la presente invención mediante las reivindicaciones que siguen a los ejemplos. En los ejemplos, todos los porcentajes se brindan en base al peso a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

[0078] Este ejemplo ilustra la caracterización de bacterias aisladas a partir de heces infantiles.

Aislamiento de bacterias probióticas

[0079] Las heces frescas se obtuvieron de un infante masculino de dos días de nacido amamantado con leche materna y las diluciones seriadas se colocaron en placas en medios TPY (tripticasa, peptona y extracto de levadura) y MRS (deMann, Rogosa and Sharpe) suplementados con 0,05% de cisteína y mupirocina. Las placas se incubaron en frascos anaeróbicos (BBL, Oxoid) utilizando kits generadores de CO₂ (Anaerocult A, Merck) de 2-5 días a 37° C. Se vetearon en busca de pureza en medios complejos no selectivos (MRS y TPY) aislados de bacterias Gram positivas, catalasa negativas en forma de varillas o bifurcadas/pleomórficas. Los aislados se cultivaron de forma rutinaria en medio MRS o TPY a menos que se declarara lo contrario a 37° C bajo condiciones anaeróbicas. Los presuntos *Bifidobacterium* se colocaron en 40% glicerol y se almacenaron a -20° C y -80° C.

[0080] Después del aislamiento de una cepa pura de bifidobacterias, a la que se le asignó la designación AH1206, se evaluaron características microbiológicas que se resumen en la Tabla 1 a continuación. La AH1206 es una bacteria de forma pleomórfica gram positiva, catalasa negativa que es Fructosa-6-Fosfato Fosfoquetolasa positiva lo que confirma su identidad como un bifidobacterium. Utilizando medios mínimos en los cuales se insertó una única

fuentes de carbono, la AH1206 fue capaz de crecer en todas las fuentes de carbono examinadas (Glucosa, Lactosa, Ribosa, Arabinosa, Raffinosa, Fructosa, Extracto de Malta, Manosa, Maltosa, Sacarosa).

Tabla 1. Características fisicoquímicas de *B. longum* AH1206

5	Características de la cepa	<i>B. longum</i> AH1206
	Tinte gram	+
	Catalasa	-
	Motilidad	-
	F6PPK*	+
10	Coagulación láctea	+
	Cultivo anaeróbico a 45° C	-
	Cultivo aeróbico a 45° C	-

Fermentación de carbohidratos

15	<i>Glucosa</i>	+
	<i>Lactosa</i>	+
	<i>Ribosa</i>	+
	<i>Arabinosa</i>	+
	<i>Galactosa</i>	+
20	<i>Rafinosa</i>	+
	<i>Fructosa</i>	+
	<i>Extracto de malta</i>	+
	<i>Manosa</i>	+
	<i>Maltosa</i>	+
25	<i>Sacarosa</i>	+

denota al ensayo de fructosa-6-fosfato fosfoquetolasa

Identificación de especies

30 **[0081]** Se llevó a cabo la secuenciación del espaciador intergénico (IGS) 16s para identificar las especies de bifidobacteria aisladas. Brevemente, el ADN se aisló a partir de AH1206 utilizando 100 µl de solución de Preparación de Tejido (Sigma, kit XNAT2). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95° C y entonces se añadieron 100 µl de Solución de Neutralización (kit XNAT2). Se cuantificó la solución genómica de ADN utilizando un espectrómetro Nanodrop y se almacenó a 4° C. Se llevó a cabo una PCR utilizando los cebadores IGS, IGS L:5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' (SEC ID No. 3) basada en la SEC ID No. 1 e IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' (SEC ID No. 4) basada en la SEC ID No. 2. Las condiciones de ciclado fueron de 94° C durante 3 minutos (1 ciclo), 94° C durante 30 segundos, 53° C durante 30 segundos, 72° C durante 30 segundos (28 ciclos). La reacción PCR contenía 4 µl (50ng) de ADN, mezcla de PCR (kit XNAT2), 0,4 µM IGS L y cebador R (MWG Biotech, Alemania). Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf. Los productos PCR (10 µl) se corrieron a lo largo de marcador molecular de peso (100 bp Ladder, Roche) en un gel al 2% de agarosa teñido EtB en TAE, para determinar el perfil IGS. Los productos PCR de *Bifidobacterium* (banda única) se purificaron utilizando el kit de purificación Promega Wizard PCR. Los productos purificados PCR se secuenciaron utilizando las secuencias cebadoras (más arriba) para la región de espaciador intergénico. Los datos de la secuencia se buscaron entonces contra la base de datos de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para determinar la identidad de la cepa por homología nucleotídica. Los datos de la secuencia resultante de ADN se sometieron al buscador NCBI de homología estándar nucleótido a nucleótido BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se identificó la coincidencia más cercana a la secuencia y entonces se alinearon las secuencias para su comparación utilizando el software DNASTAR MegAlign. Las secuencias obtenidas pueden verse en el listado de secuencias en el cual la SEC ID No. 1 es la secuencia IGS de avance directa y la SEC ID NO. 2 es la secuencia IGS inversa. La búsqueda en la base de datos NCIMB reveló que la AH1206 tiene una secuencia IGS única con su homología de secuencia más cercana a una *Bifidobacterium longum*. Una copia escrita y un formato legible de computadora del Listado de Secuencia para la Tabla se han incluido en la presente memoria y se incorporan aquí por referencia en su totalidad. El archivo legible computarizado en disco se identifica como AH1206_ST25.txt, Tamaño: 2KB, creado el 12 de septiembre del año 2008.

[0082] Para desarrollar un perfil de código de barras PCR para la AH1206, se llevó a cabo una PCR utilizando cebadores BOX. Las condiciones de ciclado fueron 94° C para 7 min. (1 ciclo); 94° C para 1 minuto, 65° C para 8 minutos, (30 ciclos) y 65° C para 16 minutos. La reacción PCR contenía 50 ng de ADN, mezcla PCR (kit KNAT2) y 0,3 µM de cebador BOXA1 R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (SEC ID No. 5) (MWB Biotech, Alemania). Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf. Los productos PCR (1 µl) se corrieron a lo largo de un marcador de peso molecular (escalera ADN 7500, Agilent, Alemania) utilizando el ADN 7500 LabChip® sobre el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Alemania). El código de barras (perfil de producto PCR) se determinó utilizando el software del Bioanalizador Agilent donde se identificaron el número pico (productos PCR) y el tamaño (Figura 1).

Perfiles de sensibilidad antibiótica

[0083] Los perfiles de sensibilidad antibiótica de la cepa *B. longum* se determinaron utilizando el ensayo de "susceptibilidad de disco". Los cultivos crecieron en un medio de caldo apropiado durante 24-48 horas, untados en placas (100 µl) en medio agar, y se colocaron en el agar discos que contenían concentraciones conocidas de los antibióticos. Las cepas se examinaron en función de su sensibilidad antibiótica después de 1-2 días de incubación a 37° C bajo condiciones anaeróbicas. Las cepas se consideraron sensibles si eran visibles zonas de inhibición de 1 mm. o más. La concentración mínima inhibitoria (MIC) para cada antibiótico se evaluó independientemente. Las MIC para clindamicina, vancomicina y metronidazol fueron de 0,32, 0,75 y 0,38 respectivamente.

Tránsito intestinal

[0084] Para determinar si la *Bifidobacterium longum* podía sobrevivir a valores bajos de pH equivalentes a los encontrados en el estómago, se cultivaron células bacterianas durante la noche a partir de cultivos frescos, se lavaron dos veces en búfer de fosfato (pH 6,5) y resuspendieron en caldo TPY ajustado a pH 2,5 (con 1 M HCl). Las células se incubaron a 37° C y la supervivencia se midió a intervalos de 5, 30, 60 y 120 minutos utilizando el método de conteo de placa. La AH1206 sobrevivió bien durante 5 minutos a un pH de 2,5 aunque no se recuperaron células viables después de 30 minutos.

[0085] A la salida del estómago, los probióticos putativos se expusieron a sales biliares en el intestino delgado. Para determinar la capacidad de *B. longum* para sobrevivir a la exposición a la bilis, los cultivos se vetearon en placas con agar en medio TPY suplementado con 0,3% (p/v), 0,5%, 1%, 2%, 5%, 7,5 o 10% de bilis porcina. Se observó el crecimiento de *B. longum* AH1206 en placas que contenían hasta 1% de bilis.

[0086] En un modelo murino, se evaluó la capacidad de *B. longum* AH 1206 para transitar por el tracto gastrointestinal. Los ratones consumieron 1×10^9 AH1206 diariamente y se examinaron los gránulos fecales en función de la presencia del microorganismo alimentado. Se facilitó la detección de AH1206 al aislar una variante de la bifidobacteria espontánea resistente a la rifampicina. La incorporación de rifampicina en las placas en medio TPY se utilizó para evaluar el tránsito y asegurar que solo se cultivaran las bifidobacterias alimentadas resistentes a la rifampicina. Las muestras fecales se recolectaron diariamente y se confirmó el tránsito de *B. longum* a través del tracto gastrointestinal (Figura 2).

Actividad antimicrobiana

[0087] Los micro organismos como indicadores patogénicos utilizados en este estudio se propagaron en el medio siguiente bajo las siguientes condiciones de crecimiento: *Salmonella typhimurium* (37° C, aeróbico) en agar/caldo de Soja Tryptone suplementado con 0,6% de extracto de levadura (TSAYE, Oxoid), *Campylobacter jejuni* (37° C, anaeróbico) y *E. coli* O157: H7(37 ° C, anaeróbico) en medio de agar Blood y *Clostridium difficile* (37° C, anaeróbico) en medio Clostridial reforzado (RCM, Oxoid). Todas las cepas se inocularon en medio de crecimiento fresco y se cultivaron durante la noche antes de utilizarlas en los experimentos.

[0088] La actividad antimicrobiana se detectó utilizando el método diferido. Brevemente, se incubó *B. longum* AH1206 durante 36-48 horas. Se untaron en placas diluciones en diez veces seriadas (100 µl) en medio agar TPY. Después de incubación durante la noche, las placas con colonias independientes se cubrieron con la bacteria indicadora. Los cultivos indicadores con zonas de inhibición mayores de 1 mm. en radio se consideraron sensibles a la bacteria de prueba. El *B. longum* AH1206 inhibió el crecimiento de todos los organismos patogénicos probados, con zonas despejadas de 14, > 80, 13,33 y 17 mm. para *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7 y *Clostridium difficile* respectivamente.

Ejemplo 2

[0089] Este ejemplo ilustra la producción de citoquina mediante PBMCs en respuesta a *B. longum*. Las PBMCs se aislaron a partir de donantes sanos mediante centrifugación de gradiente de densidad. Las PBMCs se estimularon con la cepa probiótica bacteriana durante un período de 72 horas a 37° C. En este momento se recolectó el material flotante de los cultivos, se centrifugó, se distribuyó en cuotas iguales y se almacenó a -70° C hasta ser evaluado para niveles IL-10 utilizando series citométricas de cuentas (BD BioSciences). La AH1206 indujo secreción significativa de la citoquina anti inflamatoria IL-10 mediante PBMCs humanas, sugiriendo que esta cepa puede ser útil como un agente anti inflamatorio *in vivo* (Figura 3). Como un agente anti inflamatorio, este puede ser útil en la reducción y prevención de inflamación en humanos.

Ejemplo 3

[0090] Este ejemplo ilustra el efecto de *B. longum* AH1206 en la atenuación de enfermedad respiratoria en un modelo murino de asma. Este estudio utilizó un modelo de ratón Balb/c sensibilizado con OVA de inflamación alérgica de la vía respiratoria. Los ratones se sensibilizaron con inyección intraperitoneal de OVA y la enfermedad se inició mediante inoculación intranasal. Veinticuatro horas después del último examen (día 15), los ratones se sometieron a medición de respuesta de la vía respiratoria seguido de procedimiento BAL. Los ratones sensibilizados con OVA examinados con solución salina sirvieron como controles. Comenzando el día 1 (i. e. al momento de la primera sensibilización con OVA), los animales recibieron *B. longum* AH1206 vía una aguja de ceba durante 14 días consecutivos. Los animales cebados con caldo MRS sirvieron como controles.

[0091] La inflamación de la vía respiratoria se evaluó mediante conteo de células inflamadas en fluido BAL. Las células se retiraron del fluido BAL mediante centrifugación y se resuspendieron en salino de búfer de fosfato (1 ml.). Las células BAL se tiñeron con azul trypan y las células viables se contaron utilizando un hemocitómetro. Se prepararon los untados de células BAL con una Cytospina (Thermo Shandon, Pittsburg, PA) y se tiñeron con reagente HEMA 3 (Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ) para conteos diferenciales de células, donde se contaron un total de 200 células para cada purga. El consumo de *B. longum* AH1206 redujo significativamente los conteos BAL totales en comparación con el placebo viendo la mayoría de esta diferencia en la población eosinófila (Figura 4).

[0092] Este estudio se repitió para investigar aún más si la cepa probiótica de bacterias *Bifidobacterium longum* AH1206 suprime las respuestas alérgicas en un modelo de inflamación alérgica de la vía respiratoria de ratón sensibilizado con OVA. Brevemente, los ratones machos adultos BALB/c se sensibilizaron con inyección intraperitoneal de OVA en el día 0 y día 6. En los días 12 y 14, los ratones se examinaron intranasalmente con OVA. Veinticuatro horas después del último examen (día 15), los ratones se sometieron a mediciones de la respuesta de la vía aérea seguido de procedimiento BAL. Los ratones sensibilizados con alumbre/OVA, examinados con solución salina sirvieron como control. Los animales recibieron probiótico o placebo a través de la prueba. La inflamación de la vía respiratoria (conteos de citoquina y celulares) se evaluaron mediante conteo de células inflamadas en fluido BAL. La respuesta de la vía aérea también se midió utilizando el pletismógrafo Buxco de cuerpo completo. También se aislaron los esplenocitos de los ratones sensibilizados con OVA y se incubaron en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 después de lo cual se midieron los niveles de citoquina en el material flotante mediante citometría de flujo.

[0093] El tratamiento con *B. longum* AH1206 resultó en una reducción significativa en células recuperadas del fluido BAL después del examen con OVA, en comparación con animales alimentados con caldo (Figura 5). Se midió la respuesta de la vía respiratoria y los ratones sensibilizados con OVA mostraron un mejoramiento de hiper respuesta de la vía respiratoria (AHR) a la metacolina en comparación con ratones examinados con solución salina. Sin embargo no se observó modulación de esta respuesta mejorada de la vía aérea a la metacolina, como la evaluada por los cambios en la pausa mejorada (Figura 6).

[0094] Se midieron los niveles BAL de citoquina mediante serie citométrica de cuentas sin notar diferencias significativas en los niveles de IL-10, IFN- γ , IL-6 y CCL2. La AH1206 redujo significativamente los niveles TNF- α en comparación con el control con OVA (Figura 7).

[0095] Los niveles de citoquina en material flotante de esplenocitos se cuantificaron mediante serie citométrica de cuentas (CBA) seguido de estimulación con OVA *in vitro* o anti CD3 anti CD28. El incremento en la liberación de IL-10 a partir de esplenocitos estimulados con OVA, asociado a la sensibilización *in vivo* con OVA, no se observó en los ratones alimentados con AH1206. No hubo diferencia significativa en los niveles de IL-6, TNF y MCP-1 (CCL2). La liberación de IL-10 a partir de esplenocitos CD3/CD28 no se incrementó en los animales alimentados con AH1206. Sin embargo, la secreción de las citoquinas pro inflamatorias TNF- α e IFN- γ se redujo significativamente en el material flotante del cultivo de esplenocitos de animales alimentados con AH1206 (Figura 8). No se notaron cambios significativos para las otras citoquinas medidas.

Ejemplo 4

[0096] El objeto de este estudio era investigar si las bacterias probióticas, *Bifidobacterium longum* AH1206 suprimían las respuestas alérgicas en un modelo de alergia inducida por OVA en ratón. Los ratones BALB/c se

5 dividieron en grupos (8/grupo) y se les alimentó durante cuatro semanas con placebo, *Bifidobacterium longum* AH1206, o agua destilada. Todos los ratones se cebaron oralmente semanalmente con Ovalbúmina y Toxina del Cólera con 300 µls de PBS solo como un control. Después de cuatro semanas de tratamiento, se recolectó una muestra de sangre de cada ratón vía punción de la vena facial y se llevó a cabo un ensayo inmunoabsorbente vinculado a enzima (ELISA) para medir los niveles IgE específicos de OVA. Los bazos y células mesentéricas del nodo linfático se aislaron y estimularon *in Vitro* con LPS y antiCD3/CD28 y el péptido OVA inmuno dominante. Se midieron las citoquinas Th1 y Th2 mediante CBA citométrica.

10 [0097] Se produjo una IgE OVA específica significativamente menor inducida en el grupo alimentado con AH1206 en comparación con el placebo y los grupos positivos de control (Figura 9). El grupo negativo de control y los grupos alimentados con AH1206 no fueron diferentes, lo que sugiere que la alimentación total con AH1206 previno la inducción de respuesta IgE OVA específica. Este ejemplo sugiere aún más que la administración de AH1206 puede prevenir el comienzo de inflamación en humanos. Las estadísticas se calcularon utilizando la prueba T desaparejada.

15 [0098] Los esplenocitos se aislaron a partir de ratones BALB/c alimentados con probiótico, placebo y agua destilada y se dejaron sin estimulación o se estimularon con lipopolisacárido (LPS), antiCD3/CD28, o el péptido inmuno dominante OVA y se analizaron entonces para producción de citoquinas de TNF-α, IL-2, IFN-γ, IL-4 e IL-5 mediante series citométricas de cuentas Th1/Th2. Los resultados de las citoquinas se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de citoquinas

Esplenocitos no estimulados

Cepa	TNF-α	IL-2	IFN-γ	IL-4	IL-5
AH1206					

20

LPS – Esplenocitos Estimulados

Cepa	TNF-α	IL-2	IFN-γ	IL-4	IL-5
AH1206	 rt NC		 rt NC		

Esplenocitos estimulados antiCD3/CD28

Cepa	TNF-α	IL-2	IFN-γ	IL-4	IL-5
AH1206	rt NC  rt PC 	rt NC  rt PC 	rt NC  rt P 	rt PC 	rt NC  rt PC 

25

rt = relativo a

NC = control negativo (alimentado con agua, examinado con PBS)

PC = control positivo (alimentado con agua, examinado con OVA y CT)

[0099] En esplenocitos no estimulados, no se observaron alteraciones en comparación con los animales de control. La liberación de TNF- α e IFN- γ de esplenocitos estimulados con LPS fue significativamente mayor para animales alimentados con AH1206 en comparación con los de control negativo pero estos niveles fueron consistentes con los observados en los de control positivo sensibilizados con OVA y a los que se les administró la toxina del cólera. La estimulación con CD3/CD28 reveló alteraciones profundas en señalización de linfocitos en el grupo alimentado con probióticos. Los animales alimentados con AH1206 segregaron significativamente menos TNF- α en comparación con los de controles positivos pero los niveles fueron superiores en comparación con los de controles negativos (Figura 10). Los animales alimentados con AH1206 tuvieron niveles significativamente más bajos de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5 en comparación con los de controles positivos no alimentados con probióticos.

Ejemplo 5

[0100] Este estudio investigó el efecto del consumo de probióticos en el número normativo de células T y actividad en ratones sanos. Los ratones BALB/c (10/grupo) se alimentaron con *Bifidobacterium longum* AH1206 o placebo durante tres semanas. Después del consumo de probiótico/placebo, se aislaron células normativas CD4⁺CD25⁺ T y se determinó su actividad supresora in Vitro midiendo la proliferación de células T contestatarias CD4⁺ estimuladas con antiCD3/CD28 etiquetadas CFSE utilizando citometría de flujo. Las células T contestatarias CD4⁺ se coincubaron con células CD4⁺CD25⁺ T como un control. El porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ (células T normativas) en esplenocitos de ratón que también fueron FoxP3⁺ positivas se determinó en los bazo de los ratones alimentados con probióticos o placebo.

[0101] El porcentaje de células CD4⁺ que proliferó cuando se coincubaron con células CD4⁺CD25⁺ a partir de ratones alimentados con probiótico/placebo se comparó con el porcentaje de células CD4⁺ que proliferaron cuando se coincubaron con células CD4⁺CD25⁺ del mismo ratón de prueba. En cada caso la proliferación de células T fue menor en cultivos que contenían células CD4⁺CD25⁺ en comparación con cultivos que contenían solamente células CD4 y carecían de células CD25⁺ (Figura 11).

[0102] Se determinó el porcentaje de células CD4⁺ en la población que eran también CD25⁺ (Figura 12). El grupo alimentado con *Bifidobacterium longum* AH1206 tenía significativamente más células CD4⁺T que eran CD25⁺ (i. e. células normativas T) que sus contrapartes alimentadas con placebo ($p=0,0081$). Esto sugiere que el porcentaje de células normativas T dentro de la población CD4⁺ se incrementó significativamente al alimentarlas con AH1206. Este resultado indica que la administración de AH1206 puede reducir o prevenir la inflamación en un humano.

[0103] También se determinó el número de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ en la totalidad de las poblaciones de esplenocitos de ratones alimentados con probióticos o placebo. El número de células normativas CD4⁺CD25⁺T que expresaban FoxP3 se mantuvo sin cambios en los bazo de los ratones alimentados con probióticos en relación con los ratones alimentados con placebo o no alimentados.

Ejemplo 6

[0104] Se compraron ratones libres de gérmenes de seis semanas de edad y se mantuvieron en la unidad libre de gérmenes en la unidad de servicios biológicos en UCC. Los animales consumieron la cepa probiótica *Bifidobacterium longum* AH1206 durante 14 días o se mantuvieron libres de gérmenes. La inducción de células normativas T se evaluó mediante citometría de flujo.

[0105] Los números de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en el bazo de los animales libres de gérmenes alimentados con AH1206 incrementaron significativamente después de alimentarlos con AH1206 (Figura 13). De nuevo, este resultado indica que la administración de AH1206 puede reducir o prevenir inflamación en un humano. Los conteos totales de CD3/CD4 o CD3/CD8 se mantuvieron inalterados.

Ejemplo 7: Resultados de estabilidad

[0106] La estabilidad de la cepa probiótica AH-1206 se evaluó a lo largo de 3 meses a 30° C (Figura 13). Los resultados indican que la LGG tuvo resultados pobres a lo largo del período de prueba con una caída de 2 log a lo largo del período de 3 meses mientras que la AH1206 fue muy estable sin que se registrara pérdida de viabilidad a lo largo del período.

[0107] Todas las referencias citadas en esta solicitud, incluyendo sin limitación, todos los documentos, publicaciones, patentes, solicitudes de patentes, presentaciones, textos, reportes, manuscritos, folletos, libros, avisos en Internet, artículos en revistas y en series periódicas se incorporan aquí por referencia en esta solicitud en sus totalidades. La discusión aquí de las referencias pretende solamente resumir las aseveraciones hechas por sus autores y no se declara que alguna referencia constituya técnica anterior. Los solicitantes se reservan el derecho de cuestionar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

[00108] Se pueden realizar estas y otras modificaciones y variaciones a la presente invención por aquellos expertos en la técnica, sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención, que se expone más particularmente en

las reivindicaciones adjuntas. Adicionalmente, debe entenderse que hay aspectos de las diversas realizaciones que pueden intercambiarse tanto totalmente como en parte. Aún más, los expertos en la técnica apreciarán que la descripción precedente es solo a manera de ejemplo y que no pretende limitar la presente invención así descrita adicionalmente en tales reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una fórmula infantil que comprende una fuente de proteínas, una fuente de lípidos, una fuente de carbohidratos, y *B. longum* AH1206.
2. La fórmula infantil de la reivindicación 1, en donde la fórmula infantil comprende *B. longum* AH1206 en el intervalo de alrededor de 1×10^4 cfu a alrededor de 1×10^{10} cfu por gramo de fórmula infantil.
- 5 3. La fórmula infantil de la reivindicación 1, en donde el *B. longum* AH1206 es viable.
4. La fórmula infantil de la reivindicación 1, en donde el *B. longum* AH1206 no es viable.
5. La fórmula infantil de la reivindicación 1, que comprende además un probiótico adicional.
6. La fórmula infantil de la reivindicación 5, en donde el probiótico adicional comprende LGG.
7. La fórmula infantil de la reivindicación 1, que comprende además un prebiótico.
- 10 8. La fórmula infantil de la reivindicación 7, en donde el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en lactulosa, gluco-oligosacárido, inulina, polidextrosa, galacto-oligosacárido, fructo-oligosacárido, isomalto-oligosacárido, oligosacáridos de frijol de soja, lactosacarosa, xilo-oligosacárido y gentio-oligosacáridos.
9. La fórmula infantil de la reivindicación 1, que comprende además al menos un LCPUFA.
10. La fórmula de la reivindicación 1, que comprende además ARA y DHA.
- 15 11. Un producto nutricional para niños que comprende una fuente de proteínas, una fuente de lípidos, una fuente de carbohidratos, y *B. longum* AH1206.
12. *B. longum* AH1206 para uso en un método para reducir o prevenir inflamación en un infante o niño, el método comprende la administración de *B. longum* AH1206 al infante o niño.
- 20 13. *B. longum* AH1206 para uso en el método de la reivindicación 12, en donde la reducción o prevención de inflamación mejora las alergias.
14. *B. longum* AH1206 para uso en el método de la reivindicación 12, en donde la reducción o prevención de inflamación mejora el asma.
- 25 15. *B. longum* AH1206 para uso en el método de la reivindicación 12, en donde la reducción o prevención de inflamación mejora una dolencia seleccionada del grupo que consiste en diarrea, infecciones respiratorias y otitis media.

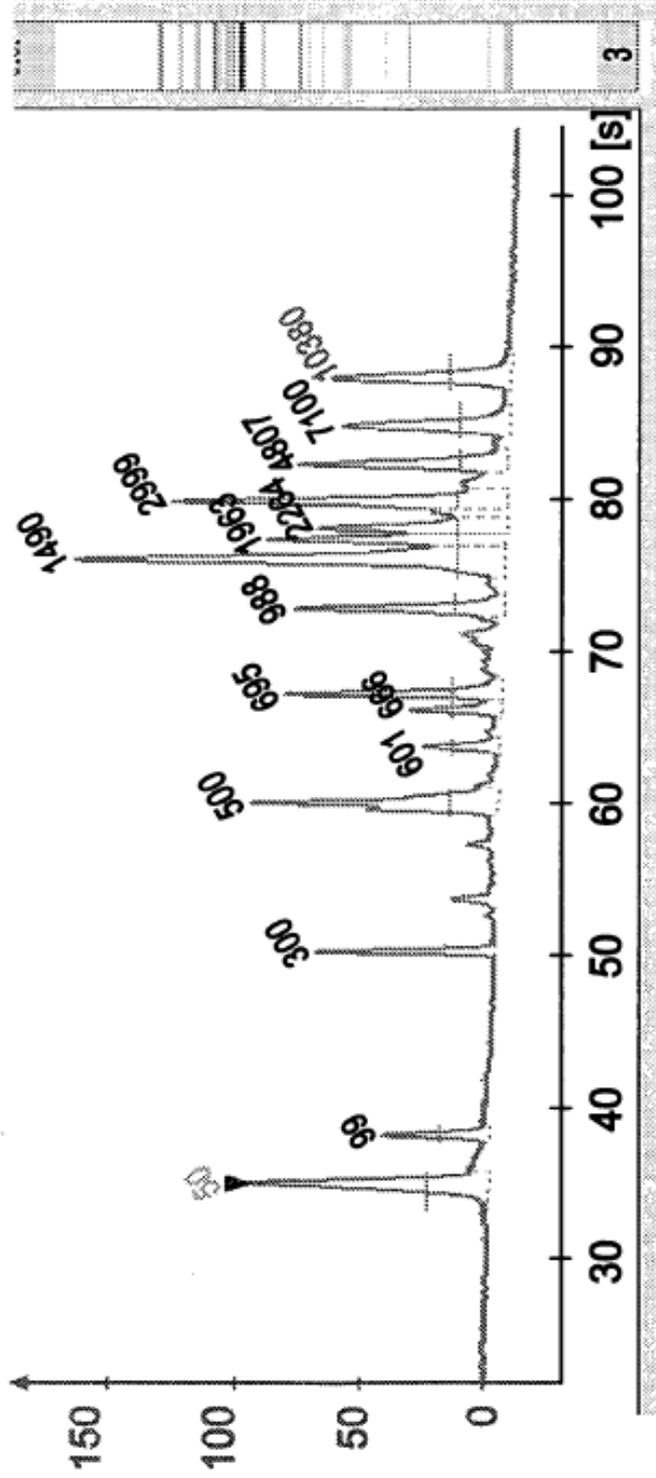


FIG. 1

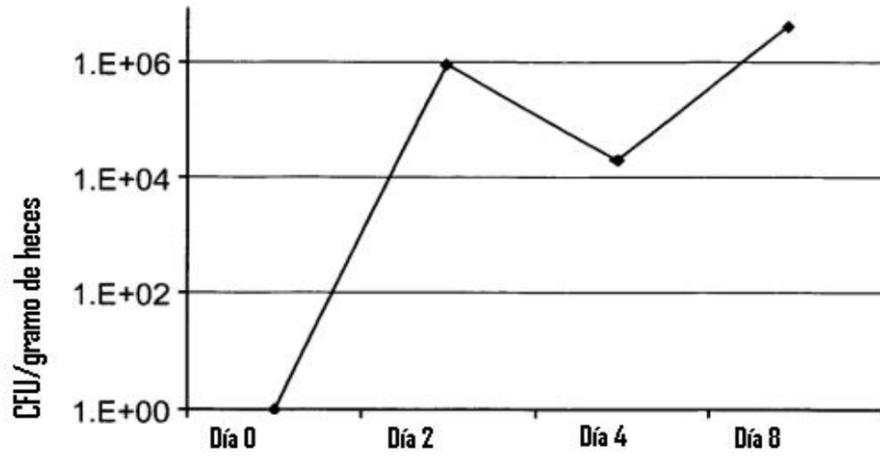


FIG. 2

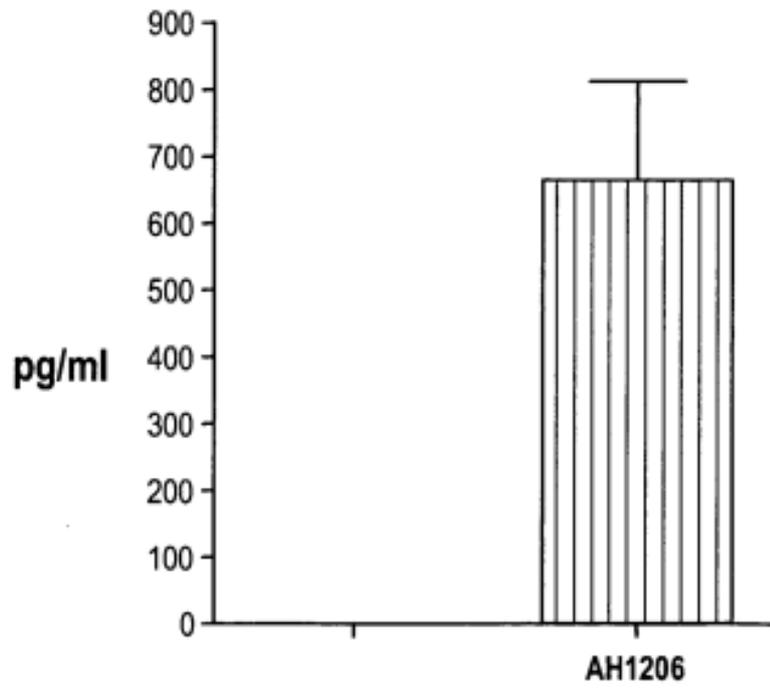


FIG. 3

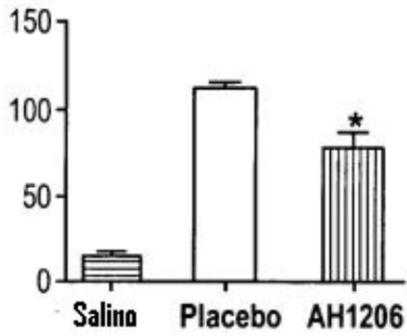


FIG. 4A

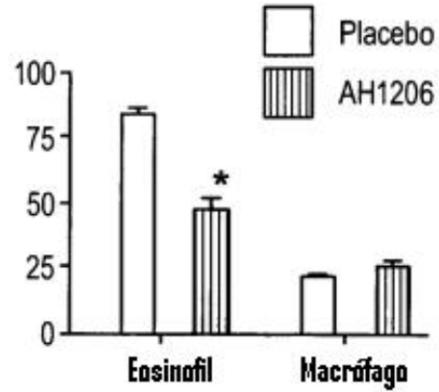


FIG. 4B

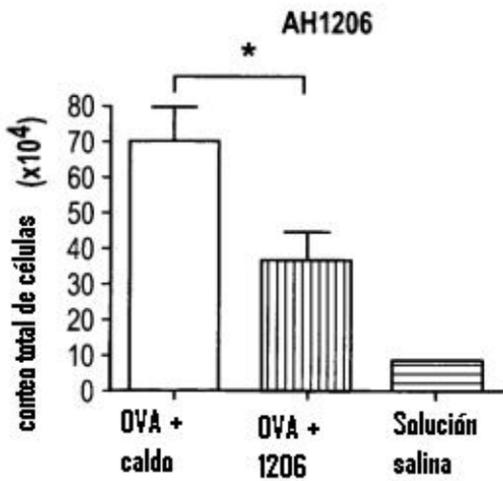


FIG. 5A

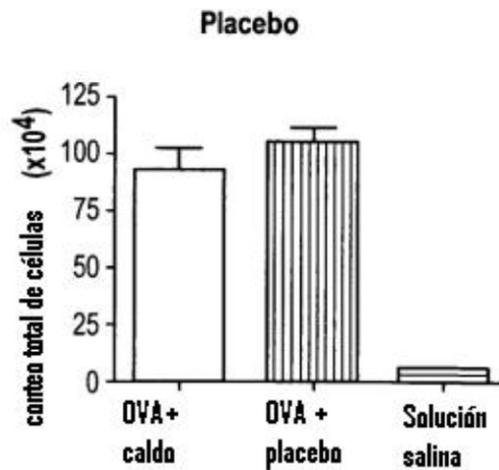


FIG. 5B

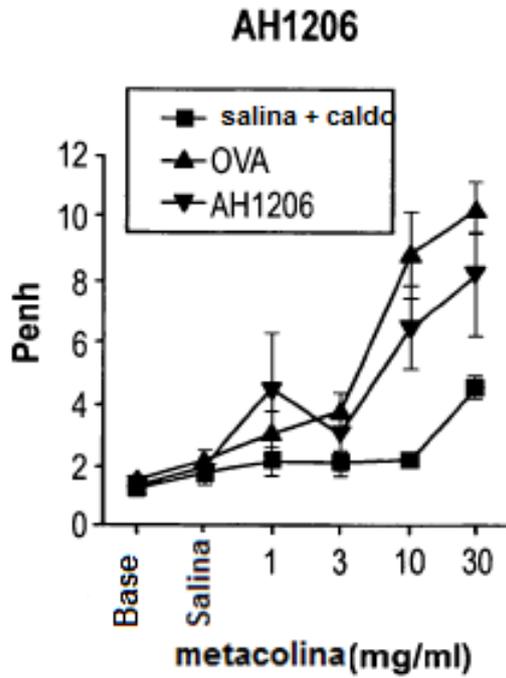


FIG. 6A

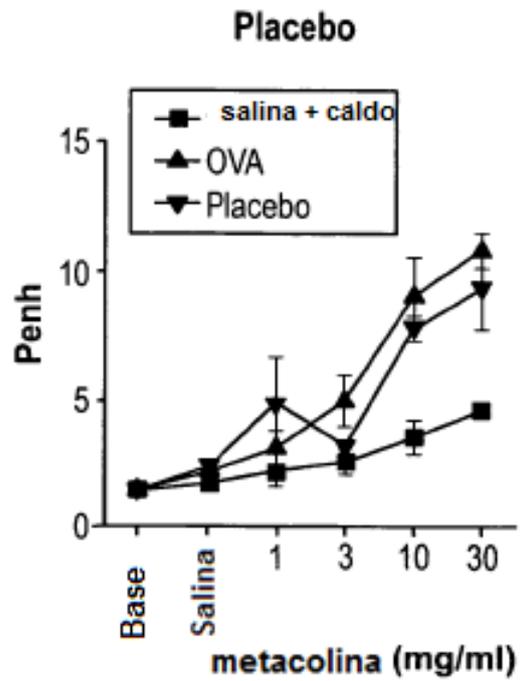


FIG. 6B

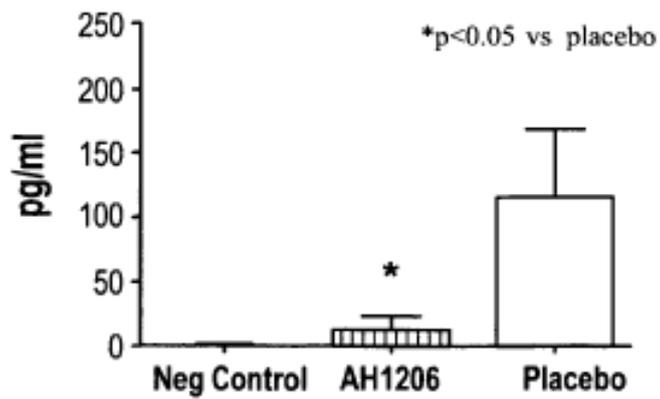


FIG. 7

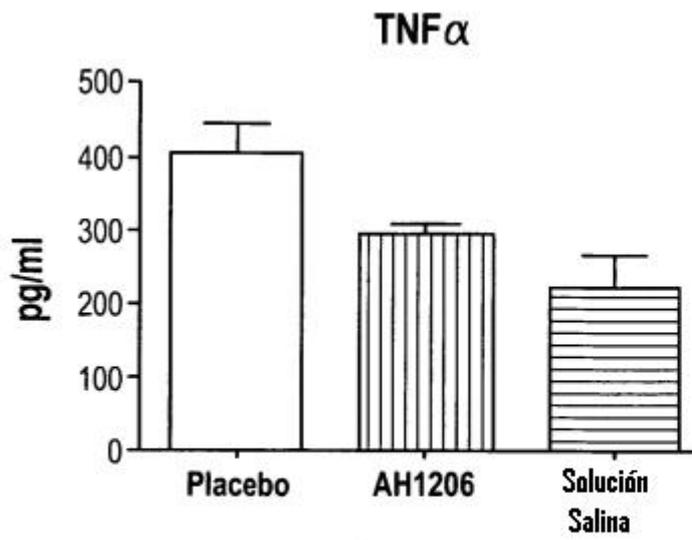


FIG. 8A

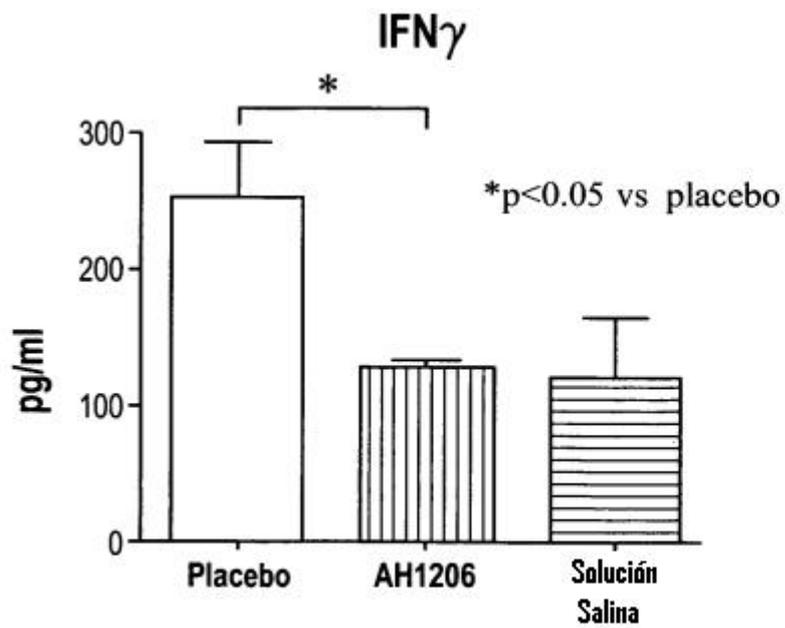


FIG. 8B

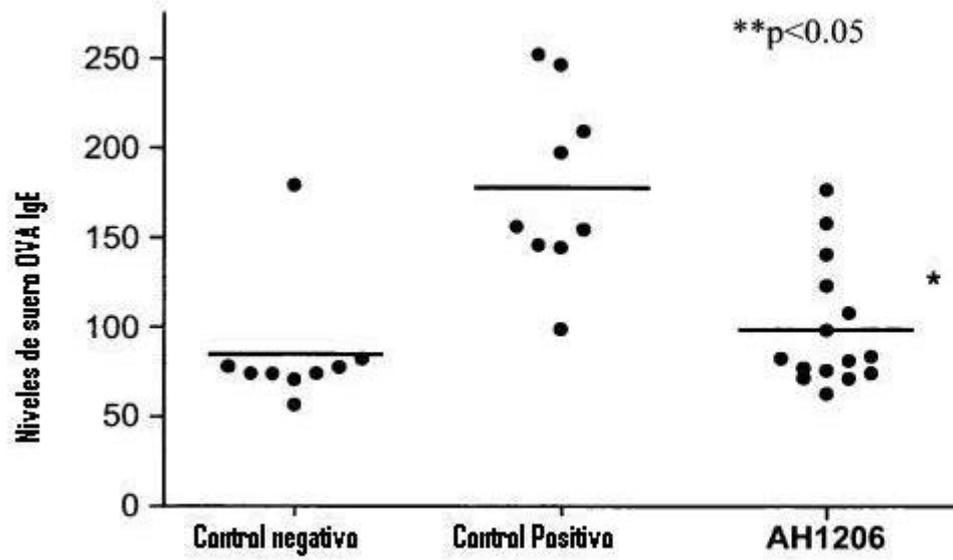


FIG. 9

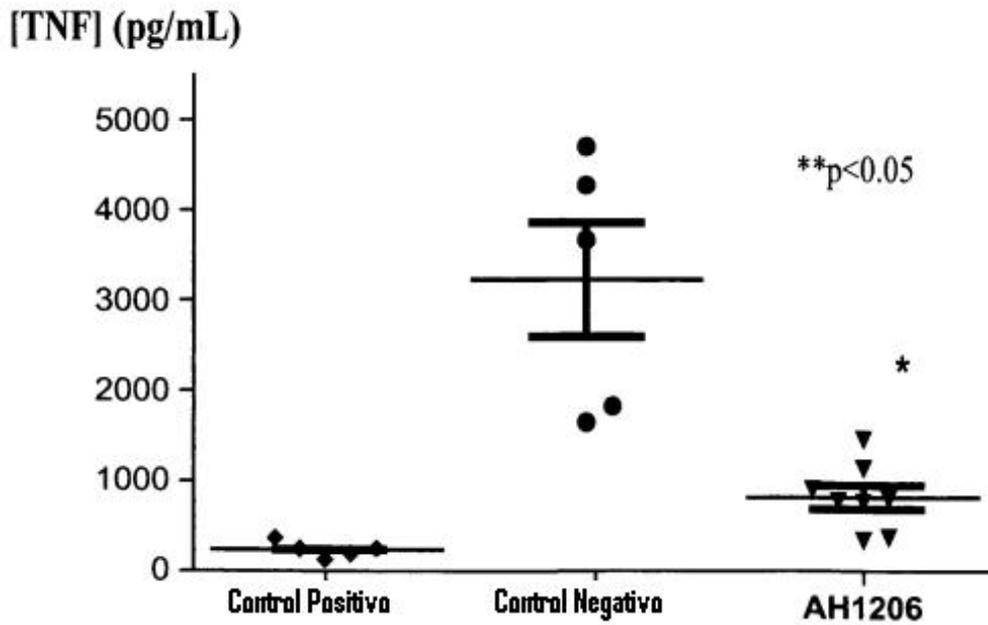
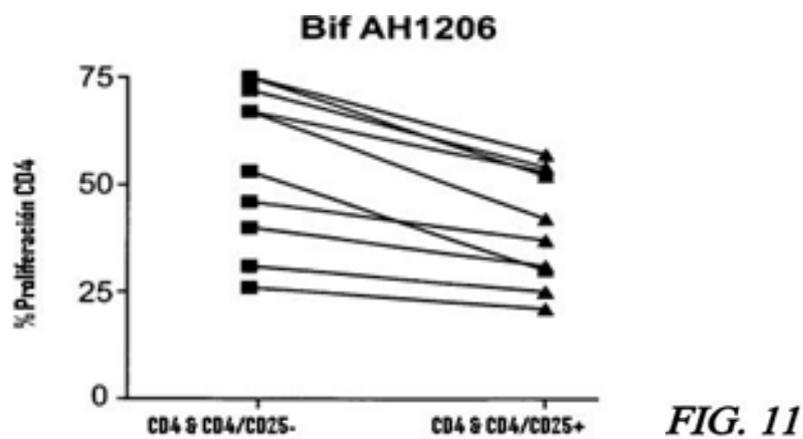


FIG. 10



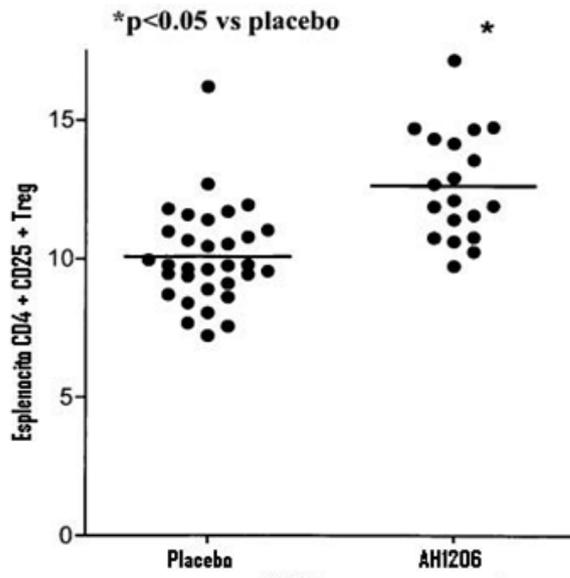


FIG. 12A

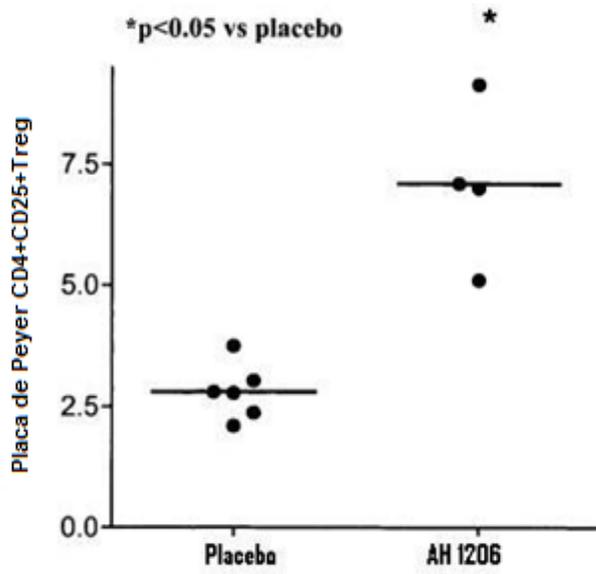


FIG. 12B

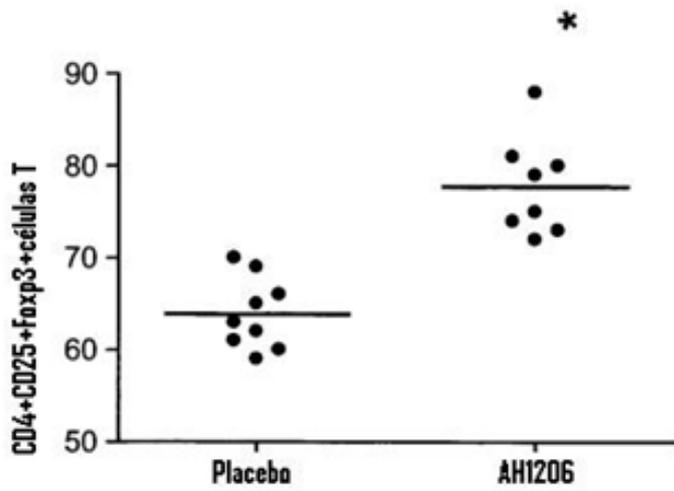


FIG. 13

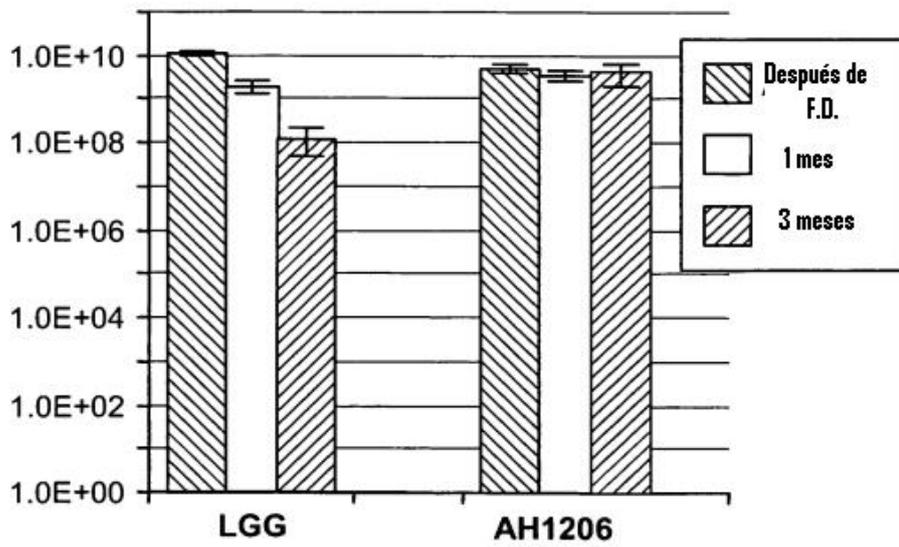


FIG. 14