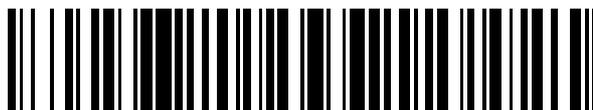


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 956**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2011 E 11784625 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2637677**

54 Título: **Microorganismos probióticos no replicantes y que protegen a los niños contra las infecciones gastrointestinales**

30 Prioridad:

11.11.2010 EP 10190847

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

13.08.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PETIT, VALÉRIE;
GARCIA-RODENAS, CLARA LUCIA;
JULITA, MONIQUE;
MERCENIER, ANNICK;
PRIOULT, GUÉNOLÉE y
NUTTEN, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 542 956 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

Microorganismos probióticos no replicantes y que protegen a los niños contra las infecciones gastrointestinales

5 La presente invención, se refiere a microorganismos probióticos, no replicantes, y a sus beneficios para la salud. De una forma particular, la presente invención, proporciona medios para ayudar a los padres, a proteger a sus chicos de las infecciones gastrointestinales, de una forma particular, de la diarrea. Una forma de presentación de la presente invención, se refiere a una composición la cual comprende microorganismos probióticos no replicantes, para su uso en la prevención o en el tratamiento de las infecciones gastrointestinales en los niños.

10 Los organismos los cuales producen ácido láctico, como componente metabólico mayor, se conocen, ya, desde hace mucho tiempo. Estas bacterias, pueden encontrarse, de una forma respectiva, bien ya sea en la leche, o bien ya sea en las factorías las cuales procesan la leche, en las plantas vivas, y en las plantas en estado de descomposición, si bien, éstas se encuentran así mismo, también, en el intestino del hombre (es decir, de los seres humanos) y en el intestino de los animales. Estos microorganismos, a los cuales se le hace referencia, de una forma resumida, como "bacterias del ácido láctico", representan un grupo más bien inhomogéneo, y éste comprende, por ejemplo, a los géneros Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Bifidobacterium, Pediococcus etc.

15 Las bacterias del ácido láctico, se han venido utilizando como agentes de fermentación, para la conservación de los productos alimenticios, sacando beneficio de un bajo valor pH y de la acción de los productos de generados durante la actividad fermentante de éstos, para inhibir el crecimiento de las bacterias de la descomposición. De una forma adicional, las bacterias del ácido láctico, se han venido también utilizando, así mismo, para la preparación de una variedad de diferentes productos alimenticios, a partir de la leche, tales como los consistentes en los quesos, el yogur, y otros productos lácteos fermentados. En un tiempo relativamente reciente, las bacterias del ácido láctico, han atraído un alto grado de atención, debido al hecho de que, se ha encontrado que, algunas cepas, exhiben unas propiedades valiosas para el hombre (es decir, para los seres humanos) y para los animales, cuando se procede a la ingestión de éstas. De una forma particular, se ha encontrado el hecho de que, cepas específicas de lactobacillus (lactobacilos) o de bifidobacterium (bifidobacterias), son capaces de colonizar la mucosa intestinal, y de asistir en el mantenimiento del bien estar del hombre y del animal.

20 Así, a este respecto, la patente europea EP 0 768 375, da a conocer cepas específicas del género bifidobacterium, las cuales son capaces de colonizar de implantarse en la flora intestinal, y de adherirse a las células intestinales. Según se reporta, estas bifidobacterias, ayudan a la inmunomodulación, siendo éstas capaces de excluir, de una forma competitiva, la adherencia de las bacterias patogénicas a las células intestinales, ayudando así, de este modo, al mantenimiento de la salud del individuo.

25 La investigación, se ha centralizado en el uso potencial de las bacterias del ácido láctico, como agentes probióticos. Los probióticos, se consideran como siendo preparaciones microbianas probióticas, las cuales fomentan la salud de individuo, mediante la conservación de la microflora natural en el intestino. Se considera el hecho de que, los probióticos, atacan a la mucosa del intestino, colonizan el tracto intestinal y, del mismo modo, previenen o evitan la adhesión de los microorganismos dañinos sobre ésta. Un prerrequisito crucial para sus acción, reside en el hecho de que, éstos, tienen que alcanzar la mucosa del intestino, de una forma apropiada y viable, y que éstos, no se destruyan en la parte superior del tracto intestinal, de una forma especial, mediante la influencia del reducido valor del pH, el cual predomina en el estómago.

30 Mientras tanto, un trabajo de investigación, se encuentra en parte enfocado a la provisión de cepas bacterianas de probióticos, adicionales, las cuales exhiben nuevas propiedades beneficiosas adicionales, para el hombre (es decir los seres humanos) y / o para los animales, tales como los consistentes en los animales de compañía o domésticos

35 La patente estadounidense U S 6 998 119 B1, pertenece, a este respecto, al uso del Bifidobacterium no patogénico CNM - 2168, para la preparación de un soporte, para el tratamiento o la profilaxis de la diarrea, provocada por rotavirus.

40 La patente estadounidense US 2005 260 170 A1, describe el hecho de que, el Bifidobacterium longum CNM I-2169 y el Bifidobacterium longum CNM I-2170, han mostrado prevenir o evitar la colonización de las células intestinales, mediante bacterias las cuales provoquen diarrea, tales como las consistentes en las bacterias de E. coli, patogénico, como las consistentes en, por ejemplo, la E. coli enteropatogénica (EPPC), ó salmonela, tal como por ejemplo, la Salmonella typhimurium.

45 Las infecciones gastrointestinales, tales como, por ejemplo, las consistentes en la diarrea, son muy incómodas o incófortables, y éstas pueden incluso ir acompañadas de fiebre, de dolor de estómago o abdominal, y de vómitos. Ésta puede tener una duración de aprox. una o dos semanas y, de una forma usual, en los casos no complicados, ésta puede desaparecer sin la utilización de ningún tipo de tratamiento.

Las medicaciones antidiarreicas, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, pero, de una forma usual, éstas deberían evitarse, de una forma particular, en el caso de niños, a menos de que, la medicación en cuestión, se encuentre recomendada por parte de un doctor.

5 Así, de este modo, sería deseable el poder disponer de una composición la cual se encuentre disponible, y la cual ayude a los padres, a proteger a sus niños, contra la diarrea. La composición en cuestión, debería ser fácil de preparar, y su actividad, debería seguir siendo alta, incluso en el caso en el que, un producto, se haya almacenado durante un prologando transcurso de tiempo. La composición en cuestión, debería permitir el tratar o prevenir o evitar las infecciones gastrointestinales, de una forma segura, y si efectos secundarios. El tiempo de duración de la diarrea, debería reducirse y / o el tiempo necesario para recuperarse de la diarrea, debería reducirse. Así mismo, también, debería reducirse el riesgo de contraer una diarrea.

15 Así, de este modo, consistía un objetivo de la presente invención, el aportar, al arte especializado de la técnica, una composición, la cual cubra una o más de las necesidades anteriormente mencionadas, arriba.

Los presentes inventores, se sorprendieron, al ver que éstos podían lograr este objetivo, mediante el contenido de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes, desarrollan, de una forma adicional, la idea de la presente invención.

20 De una forma correspondientemente en concordancia, la presente invención, se refiere a una composición, la cual comprende microorganismos probióticos, no replicantes, para su uso en la prevención o en tratamiento de las infecciones gastrointestinales, en los niños.

25 La presente invención, se refiere así mismo, también, al uso de microorganismos probióticos, no replicantes, en la preparación de una composición, para tratar o prevenir las infecciones gastrointestinales, en los niños.

30 Los niños en cuestión, pueden ser niños humanos, o bien, éstos pueden ser cachorros animales. Los cachorros animales, comprenden, de una forma particular, a los animales domésticos o de compañía, tales como, por ejemplo, los perros y los gatos.

Un humano o un animal, se considera como siendo un niño, en el caso de los humanos, y un cachorro, en el caso de los animales, hasta que éstos hayan alcanzado la edad adulta.

35 Para los seres humanos, los niños, son los humanos que tienen hasta 18 años de edad. Los niños pequeños o lactantes (bebés), son los humanos de una edad inferior a los 12 meses.

40 Los microorganismos probióticos "no replicantes", incluyen a las bacterias probióticas, las cuales se han tratado mediante calor. Esto incluye a los microorganismos los cuales se han inactivado, o los cuales se han eliminado, o los cuales no son viables y / o que se encuentran presentes como fragmentos, tales como los consistentes en el DNA, los metabolitos, los compuestos citoplásmicos, y / o materias de la pared celular.

45 "No replicante", pretende dar a entender el hecho de que, no pueden detectarse células viables y / o unidades de formación de colonias, mediante los procedimientos clásicos de galvanoplastia. Tales tipos clásicos de galvanoplastia, se encuentran resumidos en la obra consistente en el siguiente libro de microbiología de los autores James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden, del año 2005, titulado Modern food microbiology, Microbiología moderna de los productos alimenticios -, 7ª Edición, Springer Science, New York, N.Y. 790 p. De una forma típica, la ausencia de células viables, puede mostrarse del siguiente modo: ninguna existencia de colonias visibles en las placas de agar, y ninguna turbidez incrementante en el medio cultivo, después de la inoculación con diferentes concentraciones de preparaciones bacterianas (muestras "no replicantes") y la incubación, en unas condiciones apropiadas (a saber, una condiciones correspondientes a una atmósfera aeróbica y / anaeróbica, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 24 horas).

50 Los probióticos, se definen, para los propósitos de la presente invención, como "Preparaciones o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso en la salud o en el bienestar del huésped", (véase, a dicho efecto, Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. et al "Probiotics: how should they be defined", - Probióticos: de qué forma deberían definirse éstos -, Trends Food Sci. Technol. 1999: 10 107 - 10).

60 La posibilidad de utilizar microorganismos probióticos no replicantes, ofrece diversas ventajas. En los bebés (lactantes) o en los niños de corta edad, gravemente inmunocomprometidos, el uso de probióticos vivos, puede encontrarse limitado, en casos excepcionales, debido a riesgo potencial de desarrollar una bacteremia. Los probióticos no replicantes, pueden no obstante utilizarse sin ningún tipo de problema.

65 De una forma adicional, la provisión de microorganismos probióticos no replicantes, permite la reconstitución en caliente, al mismo tiempo que se conservan los beneficios para la salud.

La composición de la presente invención, puede ser cualquier clase de composición la cual sea apropiada para la administración a los seres humanos o a los animales domésticos o de compañía. Por consiguiente, la composición en cuestión, puede ser un producto alimenticio, un producto alimenticio para animales de compañía o domésticos, un nutracéutico, un suplemento alimenticio, una composición nutritiva en polvo, un aditivo alimenticio, o una bebida.

5 La infección gastrointestinal en cuestión, puede ser la consistente en una diarrea. La diarrea, puede tratarse de una gastroenteritis vírica aguda, o bien, ésta puede tratarse de una diarrea aguda inflamatoria, por ejemplo.

10 Puesto que, las infecciones gastrointestinales se encuentran asociadas, de una forma usual, con un disconfort o malestar y, algunas veces, con un desconcierto o aprieto, existe por lo tanto una necesidad en cuanto al hecho de proteger a los niños contra las infecciones gastrointestinales.

15 Los inventores, se encontraron sorprendidos al ver, por ejemplo, en términos de un efecto inmuno-estimulante / o en términos de un efecto antiinflamatorio, el hecho de que, los microorganismos probióticos no replicantes, pueden incluso ser más efectivos que los microorganismos probióticos no replicantes.

20 De una forma adicional, la cepa de La1 (NCC533, número de depósito CNCM I-1225) tratada mediante calor, induce fuertemente la expresión de la defensina. Las defensinas, son una de las clases más importantes de péptidos antimicrobianos en los seres humanos. Las defensinas, se producen mediante las células epiteliales del pulmón, de la piel, de la cavidad oral, del tracto genitourinario, del tracto respiratorio y del tracto gastrointestinal. Entre éstas, existe la familia de las β -defensinas, incluyendo a la defensina 1 (hBD1) y a la defensina 2 (hBD2). Así, por ejemplo, se encontró el hecho consistente en que, la cepa de *L. johnsonii* (La1, NCC 533, con el número de depósito CNCM 1-1225) regula hacia arriba, es decir, aumenta la hBD1, de una forma más fuerte, que la correspondiente a su homólogo vivo. La hBD1 exhibe una actividad antibacteriana contra un amplio espectro de bacterias, incluyendo a las *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, *H. pylori* (Nuding, S., et al., 2009, *Microbes. Infect.* 11: 384 -3 93) y así, de este modo, contra los fermentos, tales como el consistente en la cepa de *Candida albicans* (véase, a dicho efecto, O'Neil, D.A. 2003, *Mol. Immunol* 40: 445 - 450) y virus (virus de la inmunodeficiencia humana) (véase, a dicho efecto, Kota, S. Et al., 2008, *J. Biol. Chem* 283: 22417 - 22429). Así, de este modo, estos péptidos antimicrobianos, reforzarán la barrera de la mucosa y, por consiguiente, limitarán la adherencia y la invasión bacteriana.

Por consiguiente, la composición de la presente invención, puede ser para su uso en la protección de los niños, contra las infecciones gastrointestinales.

35 De una forma particular, la composición de la presente invención, permitirá, a los padres, proteger a sus niños contra las infecciones intestinales.

40 La composición de la presente invención, puede también ser para su uso en el fortalecimiento de la capacidad de un niño, para luchar contra las infecciones gastrointestinales. Esto es importante, de una forma particular, debido al hecho de que, un estilo de vida activo de los niños, es muy importante para su desarrollo, pero éste involucra así mismo, también, el contacto con muchas posibles fuentes de infecciones. Los fuertes mecanismos defensivos contra las infecciones no deseadas, ayudarán en su bienestar.

45 Así, de este modo, por consiguiente, la composición en concordancia con la presente invención, puede también ser para su uso en la ayuda, a los niños, para que éstos se vean afectados de infecciones gastrointestinales de una forma menos frecuente. La probabilidad de que los niños se vean afectados de infecciones gastrointestinales, puede reducirse en un porcentaje de por lo menos un 10 %, en un porcentaje de por lo menos un 25 %, en un porcentaje de por lo menos un 30 %, ó de una forma preferible, en un porcentaje de por lo menos un 50 %.

50 Las propiedades antiinflamatorias mejoradas, así como los efectos inmuno-estimulantes mejorados de las composiciones de la presente invención y / o la expresión mejorada de la defensina, mediante la composición de la presente invención, reforzarán los mecanismos de defensa, dando como resultado menos infecciones gastrointestinales.

55 La composición de la presente invención, puede también ser para su uso en la reducción del tiempo de la duración de las infecciones gastrointestinales. Así, por ejemplo, el tiempo de la duración de las infecciones gastrointestinales, tales como la consistente en la diarrea, puede reducirse en un porcentaje de por lo menos un 10 %, en un porcentaje de por lo menos un 25 %, en un porcentaje de por lo menos un 30 %, ó de una forma preferible, en un porcentaje de por lo menos un 50 %.

60 En los niños, las medicaciones antidiarreicas, de una forma usual, no son recomendables, a menos de que se indique de una forma distinta, por parte de un médico personal. Los probióticos no replicantes de la presente invención, ofrecen una alternativa segura y natural para dichos tipos de medicaciones antidiarreicas.

65 Las composiciones en concordancia con la presente invención, pueden también ser para su uso en la ayuda, a los niños para recuperarse de las infecciones gastrointestinales, de una forma más rápida. Después de haber superado

una infección gastrointestinal, un organismo, se encuentra todavía algo débil, y necesita adaptarse a la nutrición normal, de una forma cuidadosa. La composición de la presente invención, puede utilizarse para acelerar esta fase de adaptación, de una forma significativa. Así, por ejemplo, el tiempo que necesita los niños, para recuperarse de las infecciones gastrointestinales, puede reducirse en un porcentaje de por lo menos un 10 %, en un porcentaje de por lo menos un 25 %, en un porcentaje de por lo menos un 30 %, ó de una forma preferible, en un porcentaje de por lo menos un 50 %.

La composición de la presente invención, de una forma adicional, puede contener prebióticos. Los prebióticos, pueden estimular el crecimiento de los probióticos, antes de que éstos se conviertan en no replicantes. "Prebiótico", significa substancias alimenticias no digeribles, las cuales fomentan o estimulan el crecimiento de los microorganismos beneficiosos para la salud y / o probióticos, en el intestino. Éstos no se descomponen en el estómago y / o en el intestino superior, ni tampoco se absorben en el tracto GI (tracto gastrointestinal) de la persona que los ingiere, pero éstos se fermentan, mediante la microbiota o microflora intestinal y / o mediante los probióticos. Los prebióticos, se definen, por ejemplo, por parte de Glenn R. Gibson y Marcel B. Roberfroid, en Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics, - Modulación dietética de la microbiota colónica humana: Introducción del concepto de Prebióticos -, J. Nutr. 1995 125: 1401 - 1412.

Los prebióticos los cuales pueden utilizarse, en concordancia con la presente invención, no se encuentran particularmente limitados, y éstos incluyen a todas las substancias alimenticias las cuales estimulan el crecimiento de los probióticos o de los microorganismos beneficiosos para la salud en los intestinos. De una forma preferible, éstos pueden seleccionarse de entre el grupo consistente en los oligosacáridos, los cuales contengan opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; las fibras dietéticas, de una forma particular, las fibras solubles, las fibras de soja; la inulina, o mezclas de entre éstas. Los prebióticos preferidos, son los fructooligosacáridos (FQS), los galactooligosacáridos (GQS), los isomaltooligosacáridos (IMQ), los xilooligosacáridos (XQS), los arabinoxilooligosacáridos (AXOS), los mananoligosacáridos (MQS), los oligosacáridos de la soja, la glicosil sacarosa (GS), la lactosacarosa (LS), la lactulosa (LA), los palatiossa-oligosacáridos (PAO) , los maltooligosacáridos, la gomas y / o los hidrolizados de éstos. Así, por ejemplo, las composiciones, pueden contener oligofructosa, inulina o una combinación de éstos.

La composición en concordancia con la presente invención, puede comprender microorganismos probióticos no replicantes probióticos, en cualquier cantidad efectiva, tal como por ejemplo en una cantidad correspondiente a valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde las 10^6 hasta las 10^{12} ufc / g de materia seca (ufc = unidades de formación de colonias, también cfu [de sus siglas en inglés, Colony-forming unit] -).

Las composiciones de la presente invención, comprenden microorganismos probióticos no replicantes, en una cantidad suficiente como para producir, por lo menos parcialmente, un beneficio para la salud. Una cantidad apropiada para cumplir con este requisito, se define como "una dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este propósito, dependerán de un gran número de factores, los cuales son conocidos por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, así como, también, del peso y del estado general de salud del niño, y del efecto de la matriz de los alimentos.

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones en concordancia con la presente invención, se administran a una persona susceptible de poder padecer de un desorden o trastorno, o la cual está en riesgo de padecerlos, en una cantidad la cual sea suficiente como para reducir, por lo menos parcialmente, el riesgo de desarrollar tal tipo de trastorno o desorden. Tal tipo de cantidad, se define como "una cantidad profiláctica efectiva". De nuevo, otra vez, las cantidades precisas, dependerán de un gran número de factores, tales como el estado de salud del niño y del peso de éste, así como también del efecto de la matriz de los elementos.

Aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, serán capaces de ajustar la dosis terapéuticamente efectiva y / o la dosis profiláctica efectiva, de una forma apropiada.

De una forma general, la composición de la presente invención, contienen microorganismos probióticos, no replicantes, en una dosis terapéuticamente efectiva y / en una dosis profiláctica efectiva.

De una forma típica, la dosis terapéuticamente efectiva y / o la dosis profiláctica efectiva, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 0,005 mg – 1000 mg de microorganismos no replicantes, por dosis diaria.

En términos de cantidades numéricas, los microorganismos no replicantes tratados a una "alta temperatura durante un corto tiempo", pueden encontrarse presentes en la composición, en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 10^4 y 10^{12} equivalentes de ufc / g, de la composición en seco. Obviamente, los microorganismos no replicantes, no forman colonias y, por consiguiente, este término debe entenderse como la cantidad de microorganismos no replicantes, los cuales se obtienen a partir de 10^4 y 10^{12} de ufc / g de bacterias replicantes. Esto incluye a los microorganismos los cuales se encuentran inactivados, a los que se encuentran eliminados (es decir, muertos), o a los que se encuentran presentes como fragmentos, tales como los consistentes en DNAs, ó en paredes celulares, o en compuestos citoplásmicos. En otras palabras, la cantidad de

microorganismos la cual contiene la composición, se expresa en términos de capacidad de formación de colonias (ufc – [unidades de formación de colonias] - [o bien cfu, de sus siglas en inglés] -), de la cantidad de microorganismos como si la totalidad de los microorganismos, se tratara de microorganismos vivos, de una forma independiente en cuanto al hecho de si éstos son de hecho no replicantes, tal como inactivados o muertos, fragmentados, o de si éstos se encuentran como una mezcla de uno cualquiera o de la totalidad de estos estados.

De una forma preferible, los microorganismos no replicantes, se encuentran presentes en una cantidad equivalente, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde las 10^4 ufc / g, hasta las 10^{12} ufc, de la composición en seco, siendo dicha cantidad, de una forma incluso más preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre las 10^5 ufc / g y las 10^{12} ufc, de la composición, en seco.

Los probióticos, pueden convertirse en no replicantes, mediante cualquier procedimiento el cual sea conocido en el arte especializado de la técnica.

Las tecnologías hoy en día disponibles, para convertir a las cepas probióticas en no replicantes son, de una forma usual, el tratamiento por calor, la irradiación y, la luz UV, o el uso de determinados agentes químicos (tales como los consistentes en la formalina y el paraformaldehído).

Sería preferible el utilizar una técnica, para convertir a los probióticos en no replicantes, la cual sea relativamente fácil de aplicar, en unas circunstancias industriales, en la industria alimenticia.

La mayor parte de los productos hoy en día existentes en el mercado, los cuales contienen probióticos, se tratan mediante calor, durante su proceso de producción. Así, de este modo, sería conveniente el poder tener la capacidad de tratar los probióticos, bien ya sea conjuntamente, con el producto producido, o bien ya sea, por lo menos, de una forma similar, mientras que, al mismo tiempo, los productos, retengan o mejoren sus propiedades beneficiosas, o que incluso adquieran nuevas propiedades beneficiosas para el consumidor.

Sin embargo, no obstante, la inactivación de los microorganismos probióticos, mediante tratamientos basados en el calor, se encuentra asociada, según se informa en la literatura especializada, de una forma general, con una pérdida, por lo menos parcial, de la actividad probiótica.

Los presentes inventores, han encontrado ahora, de una forma sorprendente, el hecho de que, el convertir los microorganismos probióticos en no replicantes, por ejemplo, mediante un tratamiento por calor, no tiene como resultado la pérdida de los beneficios para la salud, sino que, por el contrario, dicha conversión, puede mejorar los beneficios para la salud ya existentes, e incluso puede generar nuevos beneficios para la salud.

Así, de este modo, una forma de presentación de la presente invención, es la consistente en una composición, en donde, los organismos probióticos no replicantes, se han convertido en no replicantes, mediante la utilización de un tratamiento por calor.

Tal tipo de tratamiento por calor, puede llevarse a cabo a una temperatura de por lo menos $71,5$ °C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 1 segundo.

Los tratamientos por calor de larga duración, o los tratamientos por calor de corta duración, son los tratamientos los cuales pueden utilizarse.

A escala industrial, hoy en día, se prefieren, de una forma usual, los tratamientos por calor de corta duración, tales como los consistentes en los tratamientos por calor del tipo UHT o semejantes (UHT = temperatura ultra alta – [de sus siglas en inglés, Ultra High Temperature] -). Esta clase de tratamiento mediante calor, reduce las cargas bacterianas, y reduce el tiempo de procesado, reduciendo con ello el deterioro de los nutrientes.

Los inventores, han demostrado, por vez primera, el hecho consistente en que, los microorganismos probióticos tratados mediante calor, a altas temperaturas, durante cortos transcurros de tiempo, exhiben unos perfiles inmunes antiinflamatorios, de una forma independiente de sus propiedades iniciales. De una forma particular, mediante la aplicación de este tratamiento por calor, o bien se desarrolla un nuevo perfil antiinflamatorio, o bien se mejora un perfil antiinflamatorio.

Es por lo tanto ahora posible, el generar microorganismos probióticos no replicantes, con perfiles inmunológicos antiinflamatorios, mediante la utilización de parámetros específicos del tratamiento por calor, los cuales se corresponden con los tratamientos por calor típicos, industrialmente aplicables, incluso si los homólogos vivos, no son cepas antiinflamatorias.

Así, de este modo, por ejemplo, el tratamiento por calor, puede ser un tratamiento a alta temperatura, a un nivel de temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los aprox. $71,5$ °C – 150 °C, durante un corto transcurso de tiempo de aprox. 1 – 120 segundos. El tratamiento a alta temperatura, puede ser el consistente en un tratamiento a alta / corto transcurso de tiempo (HTST – [de sus siglas en inglés

ES 2 542 956 T3

correspondientes a high temperature / short time] -), o un tratamiento a una temperatura ultra alta (UHT- [de sus siglas en inglés, correspondientes a Ultra High Temperature] -).

5 Los microorganismos probióticos, pueden someterse a un tratamiento a alta temperatura, a un nivel de temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los aprox. 71,5 °C – 150 °C, durante un transcurso corto transcurso de tiempo de aprox. 1 – 120 segundos.

10 De una forma más preferida, los microorganismos probióticos, pueden someterse a un tratamiento a alta temperatura, a un nivel de temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los aprox. 90 °C – 140 °C, durante un corto transcurso de tiempo de aprox. 1 – 30 segundos.

Este tratamiento a alta temperatura, convierte a los microorganismos, por lo menos en parte, en no replicantes.

15 El tratamiento a alta temperatura, puede llevarse a cabo a la presión atmosférica, normal, pero, el tratamiento en cuestión, puede también llevarse a cabo, así mismo, bajo la acción de una alta presión. De una forma típica, la presión a utilizar, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 1 bar hasta los 50 bar, siendo dicha presión, de una forma preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 1 bar hasta los 10 bar, y siendo ésta, de una forma incluso más preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los 2 bar hasta los 5 bar. De una
20 forma obvia, se prefiere el hecho de que, los probióticos, se traten mediante calor, en un medio el cual sea, o bien un medio líquido, o bien un medio sólido, cuando se procede a aplicar el calor. Una presión ideal a ser aplicada, dependerá así, de este modo, de la naturaleza de la composición, mediante la cual se suministran los microorganismos, y de la temperatura utilizada.

25 El tratamiento a alta temperatura, puede llevarse a cabo a un nivel de temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los aprox. 71,5 °C – 150 °C, pudiéndose llevar este a cabo, de una forma preferible, a un nivel de temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los aprox. 90 °C – 120 °C, y de una forma todavía más preferida, a un nivel de temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los aprox. 120 °C – 140 °C.

30 El tratamiento a alta temperatura, puede llevarse a cabo durante un corto transcurso de tiempo de aprox. 1 – 120 segundos, siendo dicho corto transcurso de tiempo, de una forma preferible, de aprox. 1 – 30 segundos, y de una forma más preferible, de aprox. 5 – 15 segundos.

35 Este marco dado de transcurros de tiempo proporcionado, se refiere al transcurso de tiempo, durante el cual, los microorganismos probióticos, se someten a una temperatura dada. Deberá tomarse debida nota, en cuanto al hecho consistente en que, en dependencia de la naturaleza y de la cantidad de la composición mediante la cual se proporcionan los microorganismos, y en dependencia de la arquitectura del aparato de calentamiento utilizado, puede diferir el tiempo de la aplicación del calor.

40 De una forma típica, no obstante, la composición de la presente invención y / o los microorganismos, se tratan mediante un tratamiento a alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo (HTST), mediante pasteurización flash, o mediante un tratamiento a temperatura ultra alta (UHT).

45 Un tratamiento UHT, es un procesado a temperatura ultra alta, o un tratamiento mediante ultracalentamiento (ultra calor) (ambos abreviados con las siglas UHT (de sus siglas en inglés, correspondientes a Ultra Hight Temperature] -), el cual involucra la esterilización, por lo menos parcial, de una composición, procediendo a calentar ésta, durante un corto transcurso de tiempo, de aprox. 1 – 10 segundos, a una temperatura que exceda de un valor de 135 °C (275 °F), la cual es la temperatura la cual se requiere para matar las esporas bacterianas en la leche. Así, por
50 ejemplo, el hecho de proceder a procesar la leche de este modo, mediante la utilización de unas temperaturas, las cuales excedan los 135 °C, permite una disminución de la carga bacteriana, en el necesario tiempo de mantenimiento o retención (de hasta 2 – 5 segundos), posibilitando así, de este modo, una operación de flujo continuo.

55 Existen dos tipos principales de sistemas UHT: el sistema directo y el sistema indirecto. En el sistema directo, los productos se tratan mediante inyección de vapor, o bien, éstos se tratan mediante infusión de vapor, mientras que, en el sistema indirecto, los productos, se tratan mediante la utilización intercambiador de calor de placas, mediante un intercambiador de calor tubular, o mediante un intercambiador de calor de superficie rasgada. Pueden utilizarse combinaciones de sistemas UHT, en cualquier etapa, o en las múltiples etapas, en el proceso de la preparación de
60 los productos.

Un tratamiento del tipo HTST o semejante, se define del siguiente modo (Alta temperatura / corto transcurso de tiempo): Procedimiento de pasteurización el cual está diseñado para llevar a cabo una reducción de longitud 5, matando un porcentaje del 99,9999 % del número de microorganismos viables, en la leche. Esto se considera como adecuado para la destrucción de casi la totalidad de los fermentos, de los mohos (hongos), y de las bacterias de descomposición, y asegurar así mismo, también, la destrucción apropiada de los organismos patogénicos comunes,

resistentes al calor. En el procedimiento de HTST, la leche, se calienta a una temperatura de 71,7 °C (161 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 – 20 segundos.

La pasteurización flash (también denominada pasteurización relámpago), es un procedimiento para la pasteurización del bebidas perecederas, tales como las consistentes en los zumos de frutas y en los zumos de vegetales, en las cervezas, y en los productos lácteos. Éste procedimiento, se lleva a cabo previamente al llenado al interior de los recipientes o envases, con objeto de matar los microorganismos, para convertir a los productos, en más seguros y para alargar su tiempo de vida de conservación. El líquido, se mueve, en movimiento de avance, según un flujo continuo controlado, mientras que, de una forma simultánea, éste se somete a unas temperaturas correspondientes a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los 71,5 °C (160 °F), hasta los 74 °C (165 °F), durante un transcurso de tiempo que va desde los 15 segundos hasta los 30 segundos.

Para los propósitos de la presente invención, el término “tratamiento de alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo”, se entenderá como incluyendo a la totalidad de los tratamientos consistentes en los tratamientos de alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo (HTST), los tratamientos del tipo UHT o semejantes, y los procedimientos de pasteurización flash, por ejemplo.

Puesto que, un tratamiento por calor de este tipo, proporciona probióticos no replicantes, con un perfil antiinflamatorio mejorado, la composición de la presente invención, puede ser para el uso en la prevención o en el tratamiento de los trastornos o desórdenes inflamatorios.

En el caso en el que se utilicen tratamientos de calor durante un prolongado transcurso de tiempo, con objeto de convertir a los microorganismos en no replicantes, tales tipos de tratamientos, pueden llevarse a cabo en un rango de temperatura de aprox. 70 – 150 °C, durante un transcurso de tiempo de aprox. 3 minutos – 2 horas, pudiéndose llevar éste a cabo, de una forma preferible, en un rango de temperatura de aprox. 80 – 140 °C, durante un transcurso de tiempo de aprox. 5 minutos – 40 minutos.

Mientras que, el arte especializado de la técnica anterior, enseña el hecho de que, las bacterias las cuales se han convertido en no replicantes, mediante la utilización de tratamientos por calor, durante prolongados transcurros de tiempo, de una forma usual, son menos eficientes que las células vivas, en cuanto a lo referente a los términos de ejercer sus propiedades probióticas, los presentes inventores, han sido capaces de demostrar el hecho consistente en que, los probióticos tratados mediante calor, son superiores, en cuando a los referente a la estimulación del sistema inmune, en comparación con sus homólogos vivos.

La presente invención, se refiere así mismo, también, a una composición, la cual comprende microorganismos probióticos, los cuales se han convertido en no replicantes, mediante un tratamiento por calor, a una temperatura de por lo menos 70 °C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos aprox. 3 minutos.

Los efectos mejorantes del sistema inmune de los probióticos no replicantes, se han confirmado, mediante perfilado inmune, in vitro. El modelo in vitro utilizado, utiliza el perfilado de citocinas de las células mononucleares de la sangre periférica humana (PBMs – [de sus siglas en inglés, correspondientes a Peripheral Blood Mononuclear Cells] -), y este modelo, se acepta, en el arte especializado de la técnica, como siendo un modelo estándar, para los tests de ensayo de los compuestos inmunomoduladores (véase, a dicho efecto, Schultz et al., 2003, Journal of Dairy Research 70, 165 - 173; Taylor et al., 2006, Clinical and Experimental Allergy, - Alergia clínica y experimental -, 36, 1227 - 1235; Kekkonen et al., 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192 - 1203).

El ensayo in vitro consistente en el ensayo de PBMC, se ha venido utilizando por parte de diversos autores / equipos de investigación, por ejemplo, para clasificar los probióticos en concordancia con el perfil inmune, a saber, su características antiinflamatorias o os sus características inflamatorias (véase, a dicho efecto, Kekkonen et al., 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192 - 1203). Así, por ejemplo, este ensayo, ha mostrado permitir la predicción de un efecto antiinflamatorio de los candidatos probióticos en los modelos del ratón referentes a la colitis intestinal (véase, a dicho efecto, Foligne, B., et al., 2007, World J.Gastroenterol.13: 236 - 243). De una forma adicional, este ensayo, se utiliza, de una forma regular, como instrumento de lectura, en ensayos clínicos, y éste ha mostrado conducir a unos resultados, los cuales son coherentes con los resultados clínicos (véase, a dicho efecto, Schultz et al., 2003, Journal of Dairy Research 70, 165 - 173; Taylor et al., 2006, Clinical and Experimental Allergy, Alergia clínica y experimental -, 36, 1227 - 1235).

Las enfermedades alérgicas, se han venido incrementando sin cesar, con respecto a las pasadas décadas y éstas se consideran, en la actualidad, por parte de la WHO (organización mundial de la salud – [OMS] – [WHO, de sus siglas en inglés, correspondientes a World Health Organization] -) como siendo epidémicas. De una forma la alergia, se considera como siendo el resultado de un desequilibrio, en las respuestas al desequilibrio entre la Th1 y la Th2, del sistema inmune, lo cual conduce a un fuerte tendencia hacia la producción de los mediadores de la Th2. Así, por lo tanto, la alergia, puede mitigarse, regularse mediante su disminución, o prevenirse o evitarse, procediendo a restaurar un equilibrio apropiado entre la Th1 y la Th2, las cuales son los brazos de los cuales dispone el sistema inmune. Este hecho, implica la necesidad de reducir las respuestas de la Th2, ó de mejorar, por lo menos transitoriamente, las respuestas de la Th1. Ésta última, sería característica de una respuesta inmune potenciada, la

cual viene a menudo acompañada, mediante, por ejemplo, unos altos niveles de IFN γ , TNF- α , y IL-12. (Véase, a dicho efecto, Kekkonen et al., 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192 - 1203; Viljanen M. et al., 2005, Allergy, 60, 494 - 500)

5 La composición de la presente invención, permite así, de este modo, el tratar o prevenir desórdenes o trastornos, los cuales se encuentran relacionados con una defensa inmune comprometida.

La composición descrita en la presente invención, permite así mismo, también, el mejorar la respuesta a las vacunas, de una forma particular, en cuanto a lo referente a las vacunas orales.

10 Cualquier cantidad de microorganismos no replicantes, será efectiva. Sin embargo, no obstante, se prefiere, de una forma general, el hecho de que, por lo menos un porcentaje del 90 % de los probióticos sean no replicantes, de una forma preferible, que por lo menos un porcentaje del 95 %, sean no replicantes, de una forma más preferible, que por lo menos un porcentaje del 98 %, sean no replicantes, de una forma mayormente preferible, que por lo menos un porcentaje del 99 %, sean no replicantes, de una ideal, que por lo menos un porcentaje del 99,9 %, sean no replicantes, y de la forma más ideal, que la totalidad de los probióticos sean no replicantes.

En una forma de presentación de la presente invención, la totalidad de los microorganismos, son no replicantes.

20 Por consiguiente, en la composición de la presente invención, por lo menos un porcentaje del 90 % de los probióticos son no replicantes, de una forma preferible, por lo menos un porcentaje del 95 %, son no replicantes, de una forma más preferible, por lo menos un porcentaje del 98 %, son no replicantes, de una forma mayormente preferible, por lo menos un porcentaje del 99 %, son no replicantes, de una ideal, por lo menos un porcentaje del 99,9 %, son no replicantes, y de la forma más ideal, la totalidad de los probióticos son no replicantes.

25 La totalidad de los microorganismos probióticos, pueden utilizarse para los propósitos de la presente invención.

30 Así, por ejemplo, los microorganismos probióticos, pueden seleccionarse de entre el grupo consistente en los *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetylactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y / o mezclas de éstos.

35 La composición en concordancia con la presente invención, puede comprender, por ejemplo, microorganismos probióticos, no replicantes, seleccionados de entre el grupo consistente en los *Bifidobacterium longum* NCC 3001, *Bifidobacterium longum* NCC 2705, *Bifidobacterium breve* NCC 2950, *Bifidobacterium lactis* NCC 2818, *Lactobacillus johnsonii* La1, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461, *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007, *Lactobacillus reuteri* DSM17983, *Lactobacillus reuteri* ATCC55730, *Streptococcus thermophilus* NCC 2019, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059, *Lactobacillus casei* NCC 4006, *Lactobacillus acidophilus* NCC 3009, *Lactobacillus casei* ACA-DC 6002 (NCC 1825), *Escherichia coli* Nissle, *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15, *Lactococcus lactis* NCC 2287, ó combinaciones de éstos.

45 Todas estas cepas, o bien se depositaron, según el tratado de Budapest y / o éstas se encuentran comercialmente disponibles en el mercado.

Las cepas en cuestión, se han depositado según el tratado de Budapest, de la forma que sigue:

50 *Bifidobacterium longum* NCC 3001: ATCC BAA-999
Bifidobacterium longum NCC 2705: CNCM I-2618
Bifidobacterium breve NCC 2950 CNCM I-3865
Bifidobacterium lactis NCC 2818: CNCM I-3446
Lactobacillus paracasei NCC 2461: CNCM I-2116
55 *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007: CGMCC 1.3724
Streptococcus thermophilus NCC 2019: CNCM I-1422
Streptococcus thermophilus NCC 2059: CNCM I-4153
Lactococcus lactis NCC 2287: CNCM I-4154
Lactobacillus casei NCC 4006: CNCM I-1518
60 *Lactobacillus casei* NCC 1825: ACA-DC 6002
Lactobacillus acidophilus NCC 3009: ATCC 700396
Lactobacillus bulgaricus NCC 15: CNCM I-1198
Lactobacillus johnsonii La1 CNCM I-1225
Lactobacillus reuteri DSM17983 DSM17983
65 *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 ATCC55730
Escherichia coli Nissle 1917: DSM 6601

Las cepas denominadas ATCC, se depositaron en el depósito de patentes TCC Patent Depository, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, USA.

- 5 Las cepas denominadas CNCM, se depositaron en la COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS Cedex 15, France.

10 Las cepas denominadas CGMCC, se depositaron en el organismo China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (Centro General de China, de Colección de Cultivos Microbiológico, Instituto de Microbiología, Academia China de las Ciencias), Zhongguancun, P.O.Box2714, Beijing 100080, China.

15 Las cepas denominadas ACA-DC, se depositaron en el organismo griego Greek Coordinated Collections of Microorganisms, Dairy Laboratory, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, 75, Iera Odos, Botanikos, Atenas, 118 55, Grecia.

Las cepas denominadas DSM, se depositaron en el organismo alemán DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7 B, 38124 Braunschweig, ALEMANIA.

20 Aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, entenderán el hecho de que, éstos, pueden combinar libremente todos los rasgos distintivos o características de la presente invención, los cuales se describen aquí, en este documento de solicitud de patente, sin por ello apartarse del ámbito de la presente invención, tal y como ésta se revela.

25 Las ventajas y rasgos distintivos adicionales de la presente invención, resultarán evidentes, a partir de los ejemplos y de las figuras que se describen a continuación.

30 Las figuras 1 A y B, muestran cepas probióticas, no antiinflamatorias, las cuales se convierten en antiinflamatorias, a saber, éstas exhiben unos pronunciados perfiles inmunes antiinflamatorios, in vitro, después de haberse tratado mediante "altas temperaturas durante un corto transcurso de tiempo".

35 La figura 2, muestra cepas probióticas no antiinflamatorias, las cuales se convierten en antiinflamatorias, a saber, las cuales exhiben unos pronunciados perfiles inmunológicos antiinflamatorios, in vitro, después de haberse tratado durante "un corto transcurso de tiempo, a altas temperaturas".

Las figuras 3 A y B, muestran cepas probióticas, en uso, en productos comerciales disponibles en el mercado, los cuales exhiben unos nuevos perfiles inmunes antiinflamatorios, in vitro, después de haberse tratado mediante "altas temperaturas durante un corto transcurso de tiempo".

40 Las figuras 4 A y B, muestran cepas iniciadoras lácteas (a saber, cepas iniciadoras Lc1), las cuales exhiben unos perfiles inmunes antiinflamatorios, mejorados o nuevos, in vitro, después del tratamiento por calor a altas temperaturas.

45 La figura 5, muestra una cepa probiótica, no antiinflamatoria, la cual exhibe perfiles inmunes antiinflamatorios, in vitro, después de haberse tratado mediante tratamientos del tipo HTST o semejantes.

50 La figura 6: Muestra el análisis principal de componentes en datos de PBMC (Células Mononucleares de la Sangre Periférica – [PBMC, de sus siglas en inglés correspondientes a Peripheral Blood Mononuclear Cells] -) (IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-10) generados con probióticos y cepas iniciadoras lácteas, en sus formas vivas y tratadas por calor (140 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos). Cada uno de los puntos, representa una cepa, bien ya sea viva, o bien ya sea tratada mediante calor, identificada mediante su número de NCC, o mediante su nombre.

55 La figura 7, muestra las ratios o factores de relación correspondientes a los cocientes IL-12p40 / IL-10 de las cepas vivas y de las cepas tratadas por calor (85 °C, 20 minutos). El tratamiento por calor, a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos, conduce, globalmente, a un incremento de las ratios o factores de relación correspondientes a los cocientes IL-12p40 / IL-10, de una forma opuesta a lo que ocurre mediante los tratamientos de "alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo" de la presente invención (Figuras 1, 2, 3, 4 y 5).

60 La figura 8, muestra la mejora de la secreción de citocinas, in vitro, a partir de las PBMCs (células mononucleares de la sangre periférica), estimuladas mediante bacterias tratadas por calor.

65 La figura 9, muestra el porcentaje de la intensidad de las diarreas, observado en ratones sensibilizados a la OVA (ovalbúmina), estimulados con solución salina (control negativo), en ratones sensibilizados a la OVA, estimulados con OVA (control positivo) y en ratones sensibilizados a la OVA, estimulados con OVA y tratados al calor, o *Bifidobacterium breve*. Los resultados obtenidos, se muestran como los porcentajes de la intensidad de las diarreas

(valor medio \pm error estándar de la media (mean \pm SEM – [SEM, de las siglas en inglés correspondientes a standard error of the mean] -) de 4 experimentos independientes), con un porcentaje correspondiente a un 100 % de la intensidad de las diarreas, correspondiente a los síntomas desarrollados en el grupo de control positivo (es decir, en el grupo correspondiente a los ratones sensibilizados y estimulados mediante el alérgeno).

La figura 10, muestra el hecho de que, la La1 (NCC533, número de depósito CNCM I - 1225), tratada mediante calor, a una temperatura de 120 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos, induce, fuertemente la hBD1 mRNA en las células epiteliales intestinales, in vitro, en comparación con otras cepas tratadas por calor. Se procedió a incubar las células T84, durante un transcurso de tiempo de 4 horas, con las cepas tratadas por calor. La expresión genética de la hBD1, se analizó, mediante PCR a tiempo real. Las barras, representan el valor medio \pm error estándar de la media (mean \pm SEM), normalizado a la expresión basal de las células no estimuladas.

La figura 11, muestra el hecho de que, un tratamiento a alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo, de la La1 (NCC533, número de depósito CNCM I - 1225), tiende a ser el mejor método, para inducir la expresión del mRNA de la hBD1 (hBD1 mRNA), Se procedió a estimular las células T84, durante un transcurso de tiempo de 4 horas, con la La1 (NCC533, número de depósito CNCM I - 1225), viva, y tratada mediante calor, a una temperatura de 120 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos, o bien, a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos. La expresión genética de la hBD1, se analizó, mediante PCR a tiempo real. Las barras, representan el valor medio \pm error estándar de la media (mean \pm SEM), normalizado a la expresión basal de las células no estimuladas.

Ejemplo 1

Metodología

Preparaciones bacterianas

Los beneficios para la salud proporcionados por los probióticos vivos, en el sistema inmunitario del huésped, se consideran, de una forma general, como siendo específicos de la cepa. Los probióticos los cuales inducen unos altos niveles de IL-10 y / o los cuales inducen unos altos niveles de citocinas proinflamatorias, in vitro (ensayo de PBMC), han mostrado ser potentes cepas antiinflamatorias, in vitro, (Foligné, B., et al., 2007, World J.Gastroenterol. 13: 236 - 243).

Se procedió a utilizar diversas cepas de probióticos, para investigar las propiedades antiinflamatorias de los probióticos tratados mediante calor. Estas cepas eran las consistentes en *Bifidobacterium longum* NCC 3001, *Bifidobacterium longum* NCC 2705, *Bifidobacterium breve* NCC 2950, *Bifidobacterium lactis* NCC 2818, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461, *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007, *Lactobacillus casei* NCC 4006, *Lactobacillus acidophilus* NCC 3009, *Lactobacillus casei* ACA-DC 6002 (NCC 1825), y *Escherichia coli* Nissle. Se procedió así mismo, también, a someter a test de ensayo, diversas cepas de cultivo iniciadoras, incluyendo a alguna cepas, las cuales se utilizan, comercialmente, para producir productos fermentados de Lc1, de Nestlé, consistentes en las cepas: *Streptococcus thermophilus* NCC 2019, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059, *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15 y *Lactococcus lactis* NCC 2287.

Se procedió a cultivar células bacterianas, en unas condiciones optimizadas para cada una de las cepas, en los bioreactores de 5 – 15 l. Para ello, son susceptibles de poderse utilizar cualesquiera medios de cultivo los cuales son típicos en el arte especializado de la técnica. Tales medios de cultivos, son conocidos, por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica. Cuando se procedió a ajustar el valor pH, a un nivel de 4,4, se utilizó, para ello, un solución básica, al 30 % (bien ya sea a base de NaOH, o bien ya sea a base de Ca(OH)₂), añadiéndola de una forma continua. Cuando fuere adecuado, se procedió a mantener unas condiciones anaeróbicas, mediante el gaseado del espacio de cabeza, con CO₂. El E. coli, se cultivó bajo una condiciones aeróbicas estándar.

Las células bacterianas, se recolectaron mediante centrifugación (5. 000 x g, a una temperatura de 4 °C), y se volvieron a suspender en una solución salina de tampón fosfato (PBS), en unos volúmenes apropiados, con objeto de alcanzar un concentración final de aprox. 10⁹ – 10¹⁰ ufc / ml. Una parte de la preparación, se congeló, a una temperatura de – 80 °C, con un porcentaje de glicerol del 15 %. Otra parte de las células, se trató, por calor, mediante:

- Temperatura ultra alta: a una temperatura de 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos; mediante inyección indirecta de vapor.

- Alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo (HTST): a una temperatura de 74 °C, 90 °C, y 120 °C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos, mediante inyección indirecta de vapor.

- Baja temperatura, durante un prolongado transcurso de tiempo (85 °C, 20 minutos), en un baño de agua.

Después de haber procedido al tratamiento, las muestras, se mantuvieron congeladas, a una temperatura de -80°C , hasta su uso.

Establecimiento de los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas, in vitro:

5 Se procedió a evaluar los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas vivas, y tratadas mediante calor (a saber, la capacidad de dichas preparaciones para inducir la secreción de citocinas específicas, a partir de las células de sangre humana, in vitro). Se aislaron las células mononucleares de la sangre periférica, humana (PBMCs), a partir de filtros de filtros de sangre. Después de haber procedido a la separación, mediante el gradiente de la densidad de las células, las células mononucleares, se recolectaron y se lavaron dos veces, con solución salina de Hank, equilibrada. A continuación, se procedió a resuspender las células en Medio modificado de Dulbecco de Iscove (IMDM – [de sus siglas en inglés, correspondientes a Iscove's Modified Dulbecco's Medium] -, de la firma Sigma), suplementado con un 10 % de suero bovino (de ternera) fetal (de procedencia de la firma Bioconcept, París, Francia), un 1 % de L-glutamina (de la firma Sigma), un 1% de penicilina / estreptomina (de la firma Sigma), y un 0,1 %, de gentamicina (de la firma Sigma). Se procedió, a continuación, a cultivar las células consistentes en las PBMCs (a razón de 7×10^5 células / pozo), con bacterias vivas, y tratadas mediante calor (equivalente a 7×10^6 ufc/pozo), en placas de cultivo, de 48 pozos, durante un transcurso de tiempo de 36 horas. Se procedió, a continuación, a someter a test de ensayo, las bacterias vivas y tratadas mediante calor, en las PBMCs procedentes de 8 individuos donantes, divididas en dos experimentos por separado. Después de una incubación durante un transcurso de tiempo de 36 horas, se procedió a congelar las placas de cultivo, y éstas se mantuvieron, a una temperatura de -20°C , hasta proceder a la medición de las citocinas. Se procedió, a continuación, a llevar a cabo, en paralelo, el establecimiento de los perfiles de las citocinas (a saber, en el mismo experimento, en el mismo lote de las PBMCs), para las bacterias vivas, y para sus homólogos tratados por calor.

25 Se procedió a determinar los niveles de las citocinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , e IL10), en los sobrenadantes de los cultivos celulares, después de una incubación de un transcurso de tiempo de 36 horas, mediante ensayos ELISA (kits de ensayo consistentes en los R&D DuoSet para la IL-10 humana, BD OptEIA para la IL12p40 humana, BD OptEIA para la TNF- α , BD OptEIA para la IFN- γ humana), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las IFN- γ , IL-12p40, y TNF- α , son citocinas proinflamatorias, mientras que, la IL10, es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados obtenidos, se expresan como valores medios (pg / ml) \pm error estándar de la media (mean \pm SEM) de 4 donantes individuales, y éstos son representativos de dos experimentos individuales, llevados a cabo, cada uno de ellos, con 4 donantes. Se procede a calcular la ratio o factor de relación IL-12p40 / IL10, para cada una de las cepas, como un valor predictivo del efecto antiinflamatorio in vivo (Foligné, B., et al., 2007, World J.Gastroenterol. 13: 236 - 243).

35 Los valores numéricos de las citocinas (pg / ml) determinados mediante ensayos ELISA (véase anteriormente, arriba, se transfirieron a un sistema de software informático, del tipo "BioNumerics v5.10 software" (de la firma Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Se procedió a llevar a cabo, a continuación, un Análisis de Componentes Principales (PCA – de sus siglas en inglés, correspondientes a Principal Component Analysis – [técnica de dimensionado de la clase PCA] -), en este conjunto de datos. En este análisis, se incluyó la substracción de los valores medios, con respecto a los caracteres, y la división de las variancias con respecto a los caracteres.

Resultados

45 Perfiles antiinflamatorios generados mediante los tratamientos del tipo de temperatura ultra alta (UHT) / alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo (HTST):

50 Se procedió a someter las cepas probióticas las cuales estaban bajo investigación, a unas series de tratamientos de calor (Temperatura Ultra Alta (UHT), Alta Temperatura durante un Corto Transcurso de Tiempo (HTST), y a una temperatura de 85°C , durante un transcurso de tiempo de 20 minutos), y sus perfiles inmunológicos, se compararon con aquéllos de las células vivas, in vitro. Los microorganismos vivos (probióticos y / o cultivos iniciadores lácteos), inducían diferentes niveles de la producción de citocinas, cuando éstos se incubaban con PBMCs humanas (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3, 4 y 5). El tratamiento mediante calor de estos microorganismos, modificaban los niveles de citocinas producidos por las PBMCs, de una forma dependiente de la temperatura. Los tratamientos de "alta temperatura durante un corto transcurso de tiempo" (a una temperatura de 120°C , ó de 140°C , durante un transcurso de tiempo de 15"), generaban bacterias no replicantes, con perfiles inmunológicos antiinflamatorios (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3, y 4). De hecho, las cepas tratadas mediante tratamientos del tipo UHT (a una temperatura de 140°C , durante un transcurso de tiempo de 15 segundos), inducían menos citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , e IL10), mientras que, de una forma simultánea, mantenían o inducían la producción adicional de IL-10 (en comparación con sus homólogos vivos). Los ratios o factores de relación IL-12p40 / IL10, eran inferiores, para cualesquiera de las cepas tratadas mediante tratamientos del tipo UHT o semejantes, en comparación con las ratios o factores de relación de las células vivas, (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3 y 4). Esta observación, era también válida para las bacterias tratadas mediante tratamientos del tipo HTST o semejantes, a saber, tratadas a una temperatura de 120°C , durante un transcurso de tiempo de 15 segundos (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3 y 4), o bien, a una temperatura de 74°C , durante un transcurso de tiempo de 15 segundos (véase, a dicho efecto, la figura 5). Los tratamientos por calor (es decir, los tratamientos del tipo UHT ó los

tratamientos del tipo HTST), tenían un efecto similar, en los perfiles inmunológicos de las cepas de probióticos, in vitro (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2 3 y 5) y en los cultivos iniciadores lácteos (véase, a dicho efecto, la figura 4). EL análisis de los componentes principales, en los datos de las PBMCs generados con probióticos y con cepas iniciadoras lácteas, tratados mediante calor (a una temperatura de 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 15"), revelaron el hecho de que, las cepas vivas, se extendían a lo largo de la totalidad del eje de la x, ilustrando el hecho de que, las cepas, exhibían unos perfiles inmunológicos muy diferentes, in vitro, desde los bajos inductores (en la parte izquierda), hasta los altos inductores (en lado derecho) de las citocinas proinflamatorias. Las agrupaciones de cepas tratadas por calor, en el lado izquierdo del gráfico, muestran el hecho de que, la citocinas proinflamatorias, se encuentran mucho menos inducidas, mediante las cepas tratadas por calor (véase, a dicho efecto, la figura 6. Como contraste de ello, las bacterias tratadas mediante calor, a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos, inducían más citocinas proinflamatorias y menos IL-10, que las células vivas, dando como resultado unas ratios o factores de relación más altos IL-12p40 / IL-10 (véase, a dicho efecto, la figura 7).

Los perfiles antiinflamatorios, se mejoran o se generan, mediante tratamientos del tipo UHT ó del tipo HTST.

Las cepas tratadas mediante tratamientos UHT ó HTST, exhibían unos perfiles anti-inflamatorios, de una forma independiente de sus perfiles inmunológicos iniciales respectivos (células vivas). Las cepas de probióticos, las cuales se conocen como siendo antiinflamatorias, in vivo, y que exhiben perfiles antiinflamatorios, in vitro (*B. longum* NCC 3001, *B. longum* NCC 2705, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818), mostraron exhibir unos perfiles antiinflamatorios, in vitro, después de los tratamientos del tipo "corto transcurso de tiempo, alta temperatura". Tal y como se muestra en la figura 1, las ratios o factores de relación IL-12p40 / IL-10 de las cepas de *Bifidobacterium*, tratadas con mediante tratamientos del tipo UHT o similares, eran inferiores que aquéllos correspondientes a sus homólogos, exhibiendo así, de este modo, unos perfiles anti-inflamatorios mejorados de las muestras tratadas mediante tratamientos del tipo UHT o semejantes. De una forma más llamativa, la generación de perfiles antiinflamatorios, mediante los tratamientos del tipo UHT o semejante, o del tipo HTST o semejantes, se confirmó así mismo, también, para las cepas vivas no antiinflamatorias. Ambas cepas, las correspondientes a las live *L. rhamnosus* NCC 4007 and *L. paracasei* NCC 2461, vivas, exhibían unas altas ratios o factores de relación IL-12p40 / IL-10, in vitro. (véanse, a dicho efecto, las figuras 2 y 5). Las dos cepas vivas, mostraron así mismo, también, el hecho de no ser protectoras contra la colitis inducida por TNBS, en los ratones. Las ratios o factores de relación IL-12p40 / IL-10 inducidos mediante las cepas de *L. rhamnosus* NCC 4007 y de *L. paracasei* NCC 2461, se redujeron, de una forma extremadamente remarcable, después de los tratamientos del tipo "alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo" (UHT ó HTST), alcanzando unos niveles tan bajos, como aquéllos los cuales se obtenían mediante las cepas de *Bifidobacterium*. Estos reducidos valores de las ratios o factores de relación IL-12p40 / IL-10, se deben a los bajos niveles de la producción de IL-12p40, combinada con la ausencia de cambios (*L. rhamnosus* NCC 4007) o la extremadamente remarcable inducción de las secreción de IL 10 (*L. paracasei* NCC 2461), (véase, a dicho efecto, la figura 2).

Como consecuencia de ello:

- Los perfiles antiinflamatorios de los microorganismos vivos, pueden mejorarse, mediante tratamientos por calor del tipo UHT ó semejantes, y del tipo HTST ó semejantes (tales como por ejemplo, los microorganismos correspondientes a las cepas *B. longum* NCC 2705, *B. longum* NCC 3001, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818).
- Los perfiles antiinflamatorios, pueden generarse a partir de microorganismos vivos no antiinflamatorios (tales como, por ejemplo, los microorganismos correspondientes a las cepas de *L. rhamnosus* NCC 4007, *L. paracasei* NCC 2461, los microorganismos correspondientes a los iniciadores lácteos *S. thermophilus* NCC 2019), tratados mediante tratamientos por calor del tipo UHT o semejantes, o del tipo HTST ó semejantes. o factores de relación IL-12p40 / IL-10.
- Los perfiles antiinflamatorios, se demostraron así mismo, también, para las cepas aisladas de productos comercialmente disponibles (Figuras 3 A y B), la cuales incluían un cepa probióticas de *E. coli*.

El impacto de los tratamientos del tipo UHT / HTST ó semejantes, fueron similares, para todos los probióticos e iniciadores lácteos sometidos a test de ensayo, tales como, por ejemplo, los lactobacilos, las bifidobacterias y los estreptococos.

Se procedió a aplicar los tratamientos del tipo UHT / HTST ó semejantes, los cuales exhibían diferentes perfiles inmunológicos in vitro. Todas estas cepas, inducían menos citocinas pro-inflamatorias, después de los tratamientos del tipo UHT / HTST, que los correspondientes a sus homólogos (véanse, a dicho efecto, las figuras 1, 2, 3, 4, 5 ó 6), demostrándose, con ello, el hecho consistente en que, el efecto de los tratamientos del tipo UHT / HTST ó semejantes, sobre las propiedades inmunológicas de las bacterias no replicantes resultantes, pueden generalizarse para todos los probióticos, de una forma particular, para los lactobacilos y para las lactobacterias y para las cepas específicas de *E. coli*, y para todos los cultivos de iniciadores lácteos, de una forma particular, para los estreptococos, para los lactococos y para los lactobacilos.

Ejemplo 2

Metodología

5

Preparaciones bacterianas

Se procedió a utilizar cinco cepas de probióticos, con objeto de investigar las propiedades estimulantes inmunológicas de los probióticos no replicantes: 3 bifidobacterias (*B. longum* NCC3001, *B. lactis* NCC2818, *B. breve* NCC2950) y 2 lactobacilos (*L. paracasei* NCC2461, *L. rhamnosus* NCC4007).

10

Las células bacterianas, se hicieron crecer, cultivándolas en medio de cultivo MRS, mediante fermentación en lotes, a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo de 16 – 18 horas, sin ningún tipo de control del valor pH. Se procedió a centrifugar las células en cuestión (5. 000 x g, a una temperatura de 4 °C), y éstas se resuspendieron en tampón fosfato salino (solución salina tamponada), previamente a diluirse en agua salina, con objeto de alcanzar la concentración final, la cual era la correspondiente a 10 E 10 ufc / ml. Se procedió, a continuación, a someter a las cepas de *B. longum* NCC3001, *B. lactis* NCC2818, *L. paracasei* NCC2461, *L. rhamnosus* NCC4007) a un tratamiento por calor, correspondiente a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos. La cepa de *B. breve* NCC295, se sometió a un tratamiento por calor, correspondiente a una temperatura de 90 °C, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, en un baño de agua. Se procedió a alicuotar (es decir, a dividir en alícuotos), las suspensiones bacterianas tratadas por calor, y éstas se conservaron, congeladas, a una temperatura de – 80 °C, en un tampón del tipo PBS – glicerina al 15 %, hasta su uso.

15

20

25 Establecimiento de los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas, in vitro:

Se procedió a evaluar los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas vivas, y tratadas mediante calor (a saber, la capacidad de dichas preparaciones para inducir la secreción de citocinas específicas, a partir de las células de sangre humana, in vitro). Se aislaron las células mononucleares de la sangre periférica, humana (PBMCs), a partir de filtros de filtros de sangre. Después de haber procedido a la separación, mediante el gradiente de la densidad de las células, las células mononucleares, se recolectaron y se lavaron dos veces, con solución salina de Hank, equilibrada. A continuación, se procedió a resuspender las células en Medio modificado de Dulbecco de Iscove (IMDM – [de sus siglas en inglés, correspondientes a Iscove's Modified Dulbecco's Medium] -, de la firma Sigma), suplementado con un 10 % de suero bovino (de ternera) fetal (de procedencia de la firma Bioconcept, París, Francia), un 1 % de L-glutamina (de la firma Sigma), un 1% de penicilina / estreptomina (de la firma Sigma), y un 0,1 %, de gentamicina (de la firma Sigma). Se procedió, a continuación, a cultivar las células consistentes en las PBMCs (a razón de 7 x 10⁵ células / pozo), con bacterias vivas, y tratadas mediante calor (equivalente a 7 x 10⁶ ufc/pozo), en placas de cultivo, de 48 pozos, durante un transcurso de tiempo de 36 horas. Se procedió, a continuación, a someter a test de ensayo, las bacterias vivas y tratadas mediante calor, en las PBMCs procedentes de 8 individuos donantes, divididas en dos experimentos por separado. Después de una incubación durante un transcurso de tiempo de 36 horas, se procedió a congelar las placas de cultivo, y éstas se mantuvieron, a una temperatura de – 20°C, hasta proceder a la medición de las citocinas. Se procedió, a continuación, a llevar a cabo, en paralelo, el establecimiento de los perfiles de la citocinas (a saber, en el mismo experimento, en el mismo lote de la PBMCs), para las bacterias vivas, y para sus homólogos tratados por calor.

30

35

40

45

Se procedió a determinar los niveles de las citocinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α , e IL10), en los sobrenadantes de los cultivos celulares, después de una incubación de un transcurso de tiempo de 36 horas, mediante ensayos ELISA (kits de ensayo consistentes en los R&D DuoSet para la IL-10 humana, BD OptEIA para la IL12p40 humana, BD OptEIA para la TNF- α , BD OptEIA para la IFN- γ humana), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las IFN- γ , IL-12p40, y TNF- α , son citocinas proinflamatorias, mientras que, la IL10, es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados obtenidos, se expresan como valores medios (pg / ml) \pm error estándar de la media (mean \pm SEM) de 4 donantes individuales, y éstos son representativos de dos experimentos individuales, llevados a cabo, cada uno de ellos, con 4 donantes.

50

55 Efecto in vivo del *Bifidobacterium breve* NCC2950, en la prevención de las diarreas alérgicas

Se procedió a utilizar un modelo de la diarrea alérgica, con objeto de someter a test de ensayo, el efecto estimulante de la Th1, de la cepa de *Bifidobacterium breve* NCC2950 (véase a dicho efecto, (Brandt E.B et al. JCI 2003; 112 (11): 1666 - 1667). A continuación de haber procedido a la sensibilización (2 inyecciones intraperitoneales de Ovalbúmina (OVA) y sulfato alúminico potásico, en un intervalo de tiempo de 14 días; días 0 y 14), se procedió a estimular, oralmente, a los ratones machos de la raza Balb / c, con OVA, 6 veces (en los días 27, 29, 23, 34, 36, 39), dando como resultado unos síntomas clínicos transitorios (diarrea) y cambios en los parámetros inmunológicos (concentración del plasma de IgE total, Ige OVA-específico, proteasa 1 de los mastocitos del ratón, a saber, MMCP-1. La cepa *Bifidobacterium breve* NCC2950, viva, o tratada por calor, a una temperatura de 90 °C, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, se administró, mediante la utilización de una sonda esofágica, 4 días antes de proceder a la sensibilización a la OVA (en los días, - 3, - 2, - 1, 0, y en los días 11, 12, 13 y 14), y durante el período

60

65

de estimulación (en los días 23 a 39). Se procedió a utilizar una dosis diaria bacteriana de aprox. 10^9 unidades de formación de colonias (UFC), o equivalentes, de ufc / ratón.

Resultados

- 5 Inducción de la secreción de citocinas “proinflamatorias”, después del tratamiento por calor
- Se procedió a evaluar la capacidad de las cepas bacterianas estimuladas por calor, in vitro, para estimular la secreción de citocinas, mediante células mononucleares de la sangre periférica, (PBMC). Se procedió a comparar los perfiles inmunológicos basados en cuatro citocinas, después de haber procedido a la estimulación de las PBMCs, mediante bacterias tratadas por calor, con respecto a los inducidos por células bacterianas, vivas, en el mismo ensayo in vitro.
- 10 Las preparaciones tratadas mediante calor, se colocaron en placas, y éstas se evaluaron, en cuanto a lo referente a la ausencia de cualesquiera recuentos viables. Las preparaciones bacterianas tratadas mediante calor, no produjeron colonias, después de su colocación en placas.
- 15 Los probióticos inducidos, inducían diferentes niveles de producción de citocinas, y dependientes de la cepas, cuando éstos se incubaron con PBMCs humanas (véase, a dicho efecto, la figura 8). El tratamiento por calor de los probióticos, modificaba los niveles de citocinas producidas por las PBMCs, si éstos se comparaban con sus homólogos vivos. La bacterias tratadas por calor, inducían más citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , e IL-12p40), que las inducidas por sus homólogos. Como contraste de ello, las bacterias tratadas por calor, inducían unas cantidades similares o inferiores de IL-10, en comparación con las células vivas (véase, a dicho efecto, la figura 8). Estos datos, muestran el hecho de que, las bacterias tratadas mediante calor, son más aptas, para estimular el sistema inmunológico, que sus homólogos vivos, y así, por lo tanto, éstas, tienen una mayor capacidad para estimular las defensas inmunológicas debilitadas. En otras palabras, los datos in vitro, ilustran un efecto estimulante inmunológico mejorado, de las cepas bacterianas, después de haber sido sometidos al tratamiento mediante calor.
- 20 Con objeto de ilustrar el efecto mejorado de la cepa de *B. breve* NCC2950 (en comparación con las células vivas), en el sistema inmunológico, ambas cepas de *B. breve* NCC2950, es decir, la cepa de *B. breve* NCC2950 viva, y la cepas de *B. breve* NCC2950 tratada por calor, (cepa A), se sometieron a tests de ensayo, en un modelo animal, de la diarrea alérgica.
- 30 Al compararse con el grupo de control positivo, la intensidad de la diarrea, había descendido de una forma significativa y consistente, después del tratamiento con la cepa de *B. breve* NCC2950 tratada por calor (en un porcentaje correspondiente a un valor del $41,1 \% \pm 4,8 \%$), mientras que, la intensidad de la diarrea, había descendido en únicamente un porcentaje del $20 \pm 28,3 \%$, después del tratamiento con la cepa de *B. breve* NCC2950, viva. Estos resultados, demuestran el hecho de que, la cepa de *B. breve* NCC2950 tratada mediante calor, exhibe unos efectos protectores mejorados, contra la diarrea alérgica, que la correspondiente a su homólogo vivo (véase, a dicho efecto, la figura 9).
- 35 Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, se mostró el hecho de que, la capacidad de los probióticos, para mejorar las defensas inmunológicas, se incrementaba, después del tratamiento por calor.
- 40
- 45 Ejemplo 3
- Protocolo experimental:
- Se procedió a utilizar células T84, procedentes del fragmento (pasada) 30 – 40, y éstas se cultivaron en medio esencial modificado Dulbecco / F 12 (de la firma Sigma, D 6421), el cual contenía un porcentaje del 5 % de suero bovino fetal (FCS – [de sus siglas en inglés] -) (de la firma Amimed BioConcept) y 2 de mM glutamina. La células, se sembraron a una concentración correspondiente a una tasa de 10^6 células / pozo, en placas de cultivo de 6 pozos, y se cultivaron como monocapas, a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de un 5% de CO₂ – 95 % de aire. Las células, las cuales se hicieron crecer hasta una semana después de la confluencia, se incubaron con un medio de suero y exento de antibióticos, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 12 horas. Esta etapa, era necesaria, para eliminar la expresión de la defensiva inducida por suero, y para prevenir o evitar cualquier influencia de los antibióticos, sobre los probióticos, y sobre la respuesta inmunológica celular. Las células, se incubaron de una forma adicional con probióticos o con cepas tratadas por calor, durante un transcurso de tiempo de 4 horas. Al final del tiempo de incubación, la células, se lavaron con PBS, y éstas se recolectaron con reactivo de aislamiento del tipo TriPure™, en concordancia con el protocolo del proveedor. Se procedió a evaluar la expresión genética de las hBD1 hBD2 humanas, en las células de esta forma tratadas, mediante PCR cuantitativa.
- 50 Las cepas bacterianas las cuales se utilizaron en este ensayo experimental, son las cepas consistentes en las *B. longum* (NCC 2705, número de depósito CNCM I-2618), *B. lactis* (NCC 2818, número de depósito CNCM I-3446), *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225), *L. paracasei* (ST11, NCC 2461, número de depósito CNCM I-2116). Estas cepas, se sometieron a tests de ensayo, vivas o tratadas por calor, bien ya fuere a una
- 55
- 60
- 65

temperatura de 120 °C durante un transcurso de tiempo de 15 segundos, o bien ya fuere a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos.

Resultados:

5 La cepa de La1 NCC 533, número de depósito CNCM I-1225 tratada por calor, a una temperatura de 120°C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos, inducían fuertemente la expresión del mRNA de la hBD1, después de un transcurso de tiempo de 4 horas, de incubación (véase, a dicho efecto, la figura 10), como contraste a las otras cepas tratadas por calor. Estos datos, son únicos, como expresión de la HBD1, la cual se expresa, de una forma
10 constitutiva, y se consideran, en la actualidad, por parte de la comunidad científica, como virtualmente no modulable, mediante microbios, mediante productos microbianos, o mediante la inflamación.

Ambas, la La1 (NCC 533, número de depósito CNCM I-1225) viva, o tratada por calor, inducía fuertemente la expresión del hBD1 mRNA, pero la más alta inducción de la hBD1, se producía mediante la La1 tratada mediante calor (a una alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo) (véase, a dicho efecto, la figura 11).
15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición, la cual comprende microorganismos probióticos no replicantes, para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones gastrointestinales en niños, caracterizada por el hecho de que, los microorganismos probióticos no replicantes, se han convertido en no replicantes, mediante un tratamiento por calor, a una temperatura de aprox. 120 °C a 140 °C, durante un transcurso de tiempo de aprox. 1 – 120 segundos.
- 10 2. Composición, para su uso según la reivindicación 1, en donde, los microorganismos probióticos no replicantes, se han convertido en no replicantes, mediante un tratamiento por calor, durante un transcurso de tiempo de aprox. 1 – 10 segundos.
- 15 3. Composición, para su uso según la reivindicación 2, en donde, los microorganismos probióticos no replicantes, se han convertido en no replicantes, mediante un tratamiento por calor, durante un transcurso de tiempo de aprox. 1 – 15 segundos.
- 20 4. Composición, para su uso según la reivindicación 1, en donde, la infección gastrointestinal, tiene como resultado una diarrea.
- 25 5. Composición, para su uso según una de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el fortalecimiento de la capacidad de un niño, para luchar contra las infecciones gastrointestinales.
- 30 6. Composición, para su uso según una de las reivindicaciones precedentes, la cual comprende microorganismos probióticos no replicantes, en una cantidad correspondiente a un valor que va desde las aprox. 10⁶ ufc / g, hasta las aprox. ufc / g, de composición referida a un estado seco.
- 35 7. Composición, para su uso según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, por lo menos un porcentaje del 90 %, de una forma preferible, por lo menos un porcentaje del 95 %, de una forma más preferible, por lo menos un porcentaje del 98 %, de una forma mayormente preferible, por lo menos un porcentaje del 99 %, de una forma ideal, por lo menos un porcentaje del 99.9 %, y de la forma más ideal, la totalidad de los probióticos, son no replicantes.
- 40 8. Composición, para su uso según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, los microorganismos probióticos, se seleccionan de entre el grupo consistente en bifidobacterias, lactobacilos, propionibacterias, o combinaciones de entre éstos, tales como, por ejemplo, los consistentes en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetylactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y / o mezclas de entre éstos.
- 45 9. Composición, para su uso según una de las reivindicaciones precedentes, en donde, los microorganismos probióticos, se seleccionan de entre el grupo consistente en *Bifidobacterium longum* NCC 3001, *Bifidobacterium longum* NCC 2705, *Bifidobacterium breve* NCC 2950, *Bifidobacterium lactis* NCC 2818, *Lactobacillus johnsonii* La1, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461, *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007, *Lactobacillus reuteri* DSM17983, *Lactobacillus reuteri* ATCC55730, *Streptococcus thermophilus* NCC 2019, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059, *Lactobacillus casei* NCC 4006, *Lactobacillus acidophilus* NCC 3009, *Lactobacillus casei* ACA-DC 6002 (NCC 1825), *Escherichia coli* Nissle, *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15, *Lactococcus lactis* NCC 2287, or combinaciones de entre éstos.
- 50 10. Composición, para su uso según una de las reivindicaciones precedentes, la cual contiene una cantidad de aprox. 0,005 mg – 1000 mg de microorganismos no replicantes, por dosis diaria.

Figura 1A

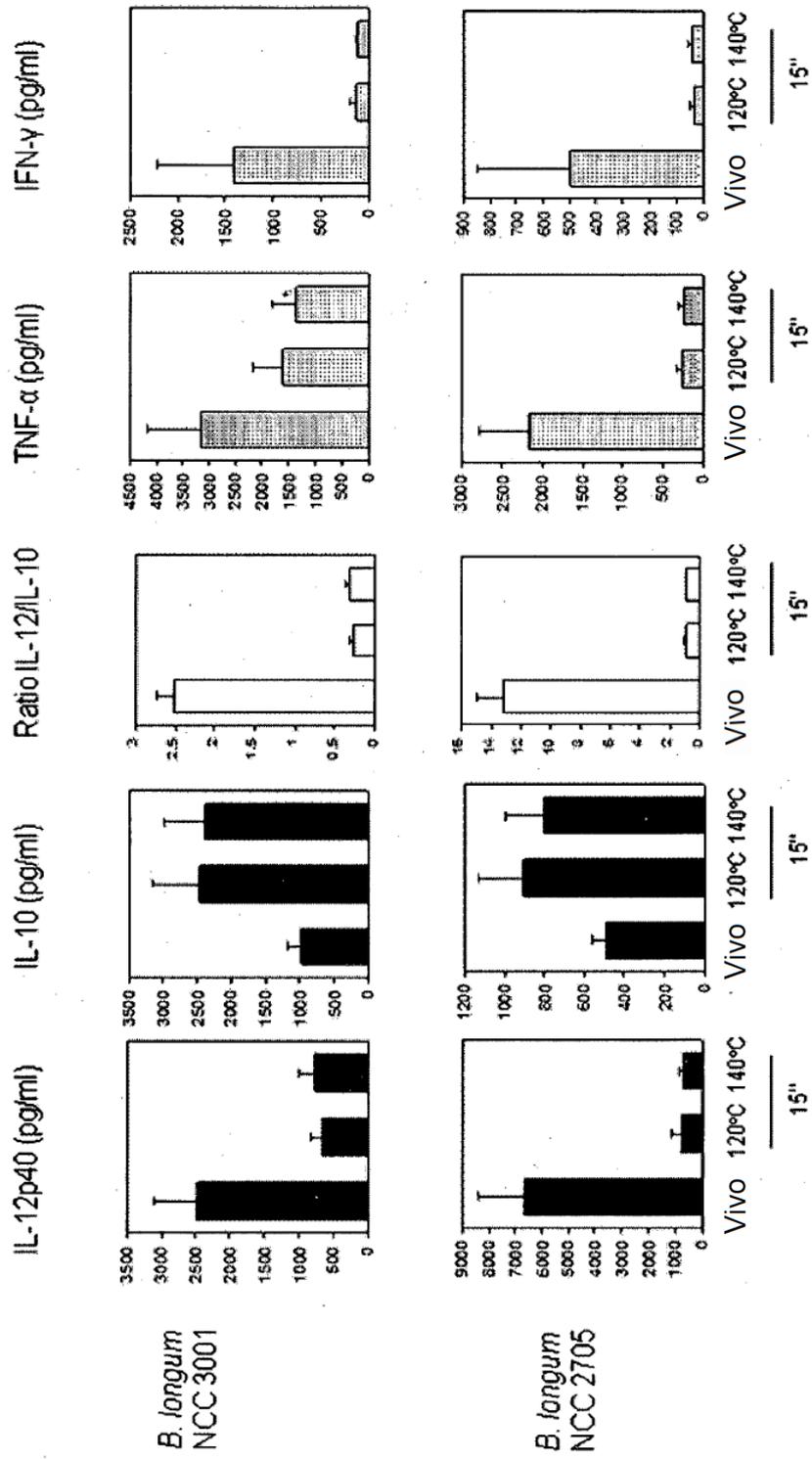


Figura 1B

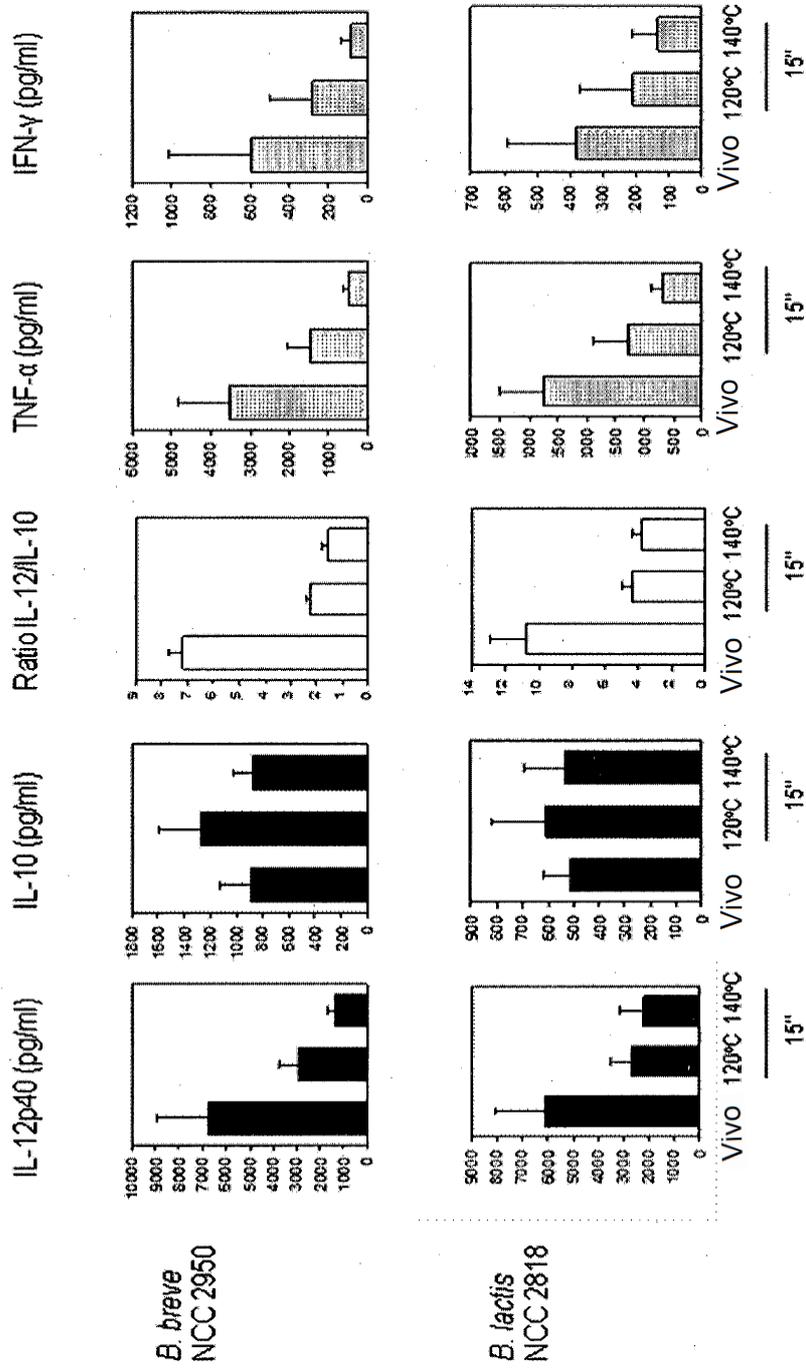


Figura 2

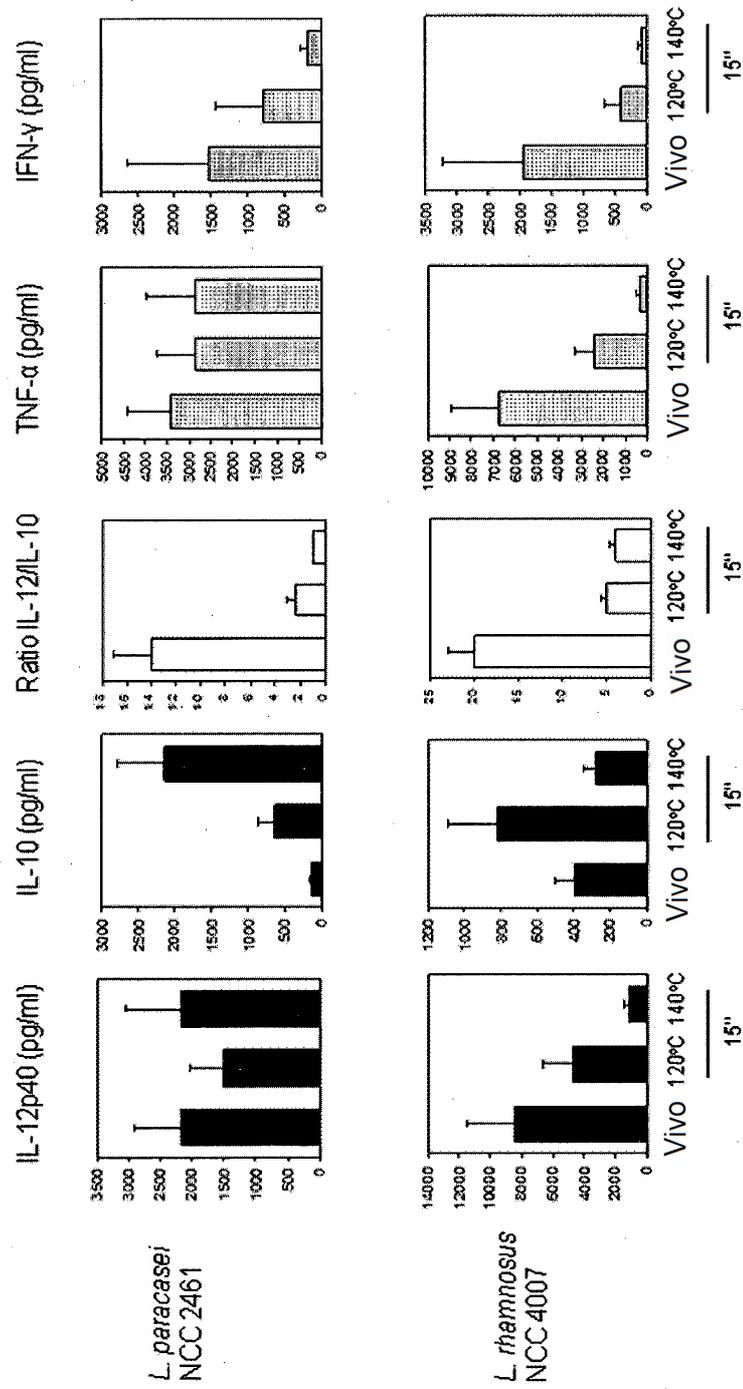


Figura 3A

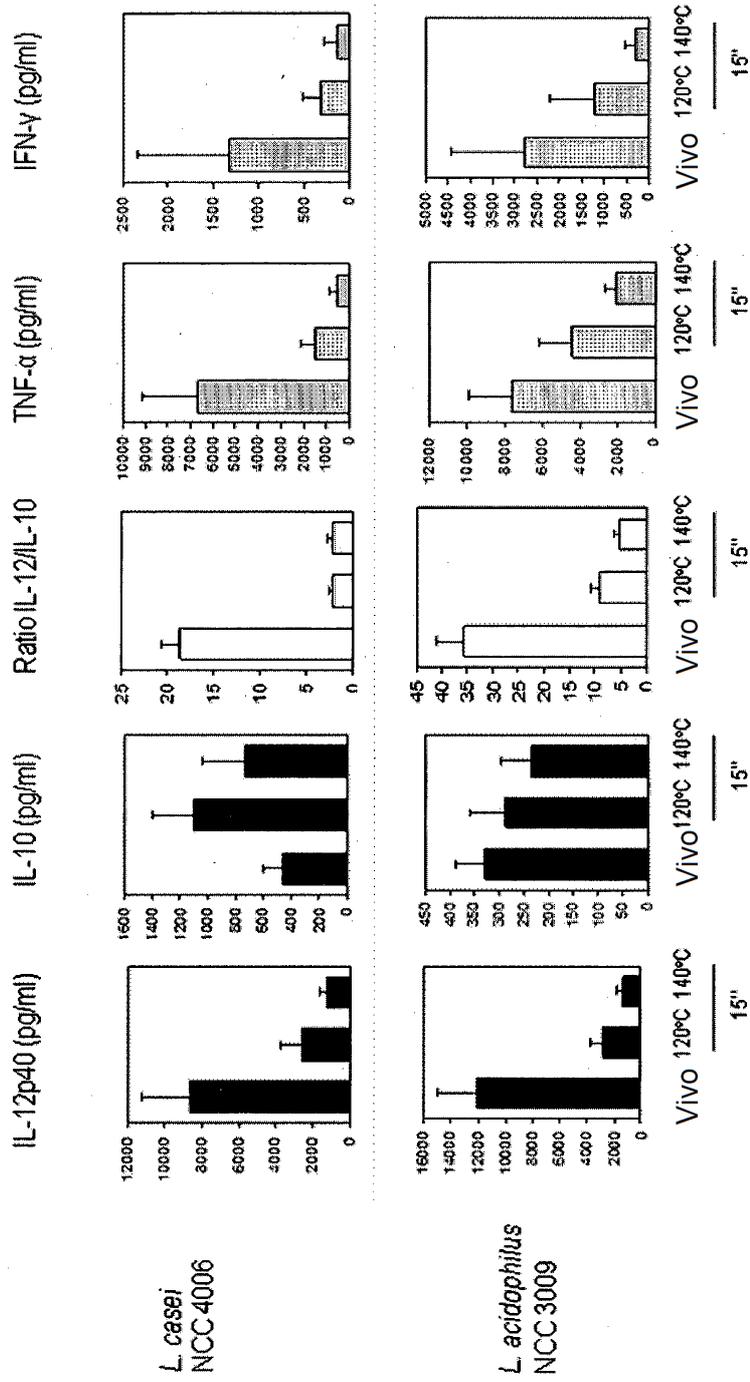


Figura 3B

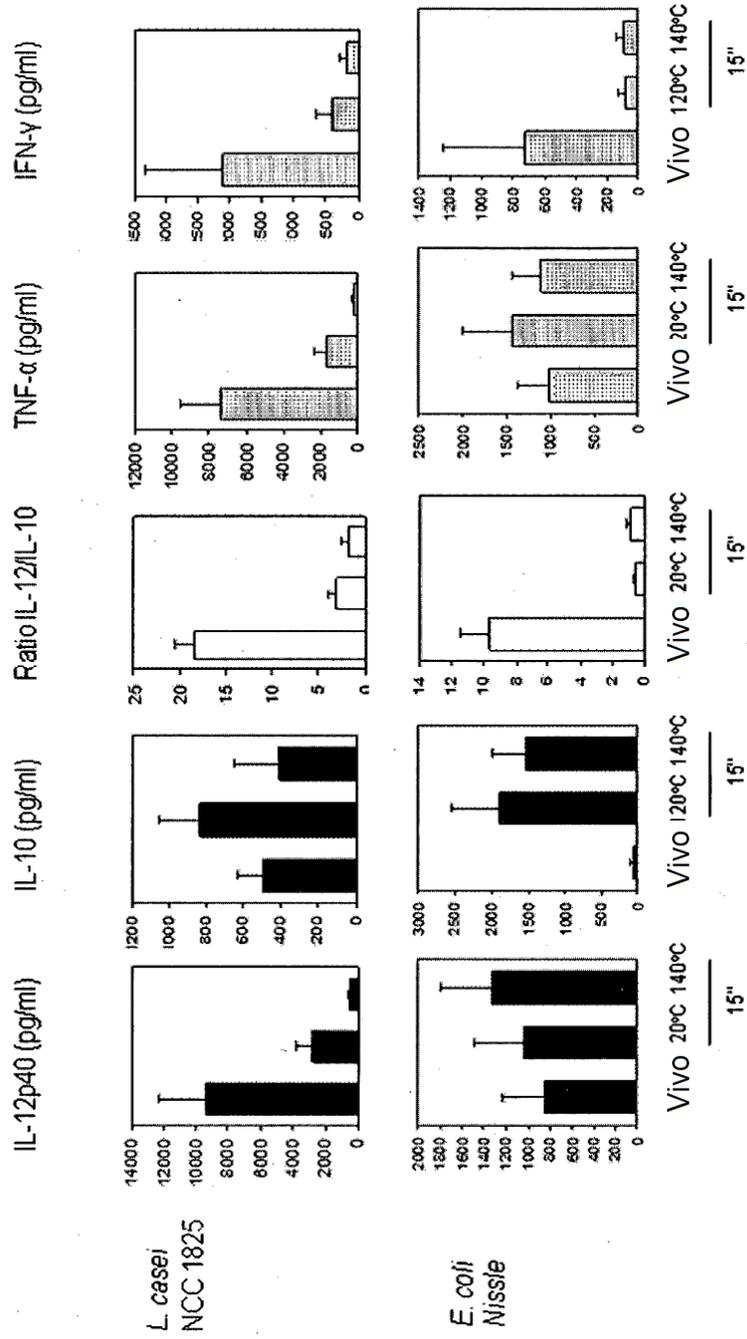


Figura 4A

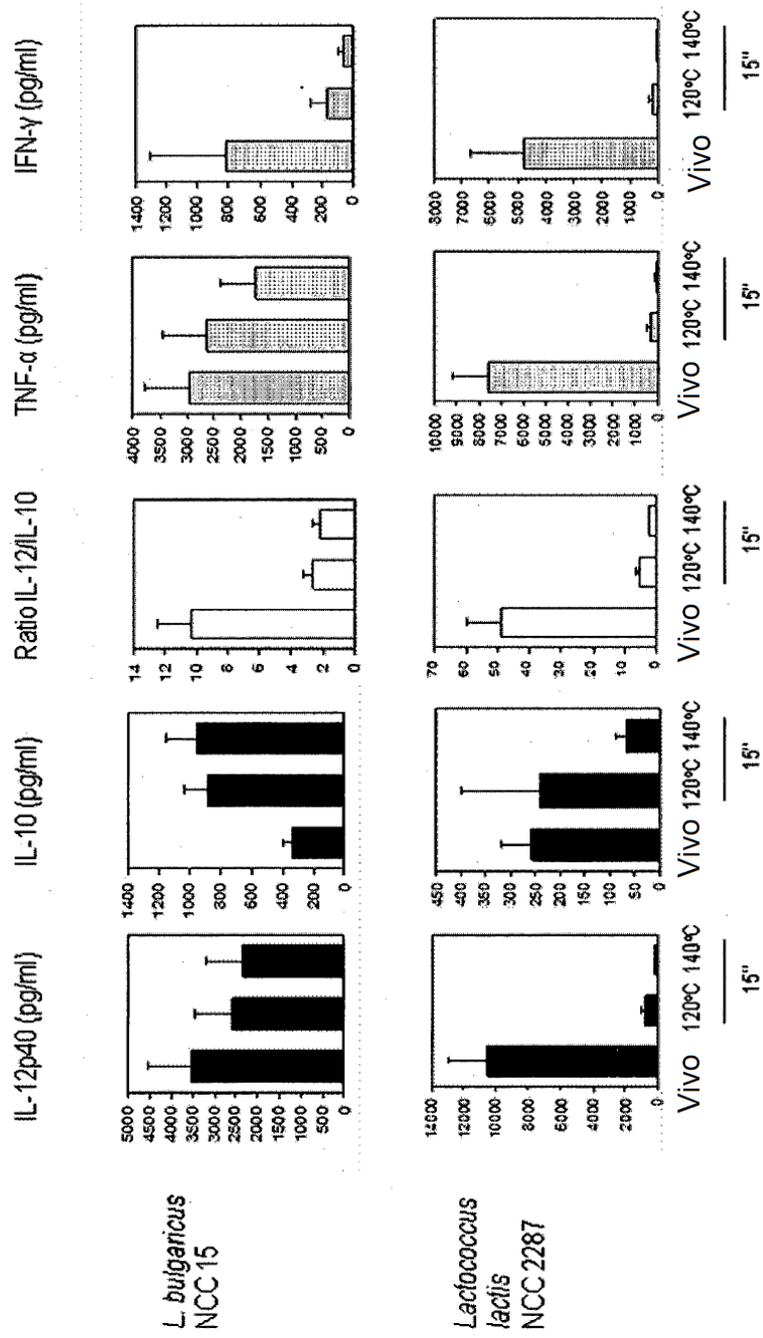


Figura 4B

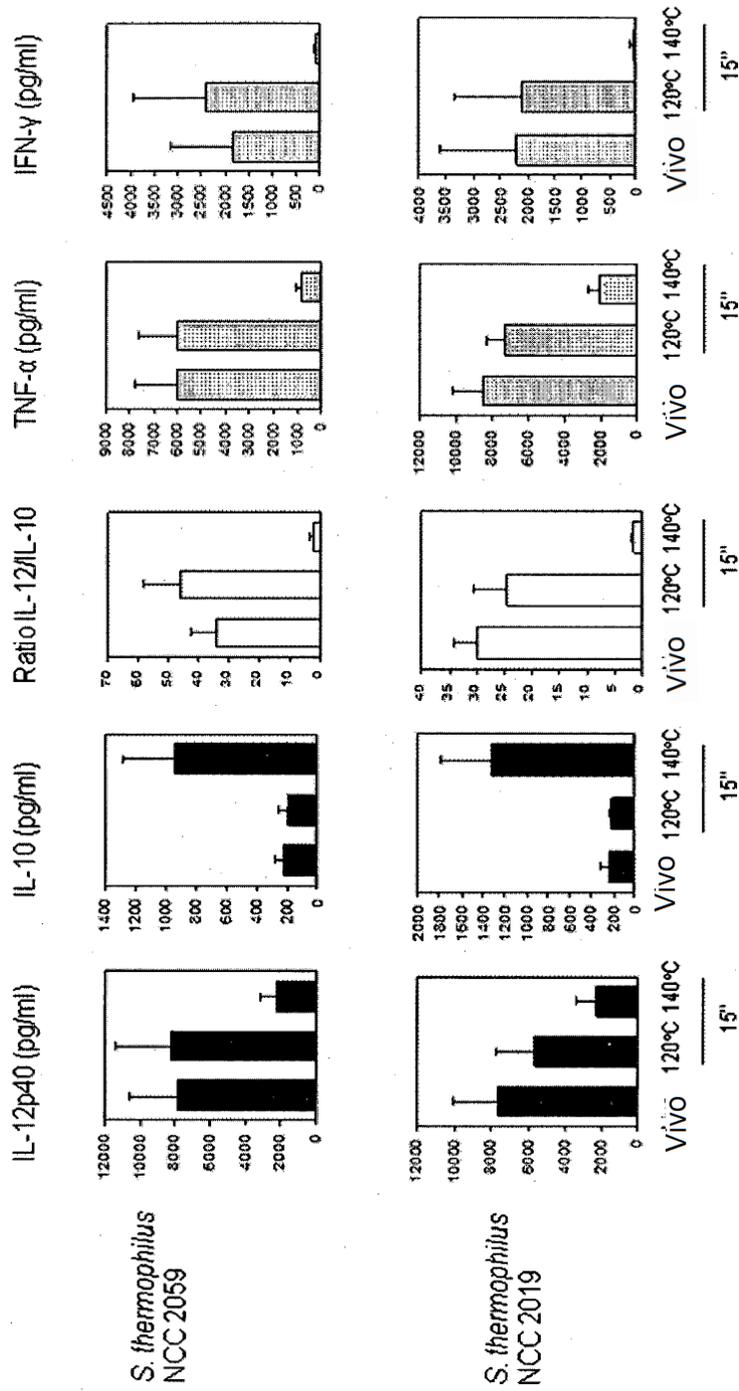


Figura 5

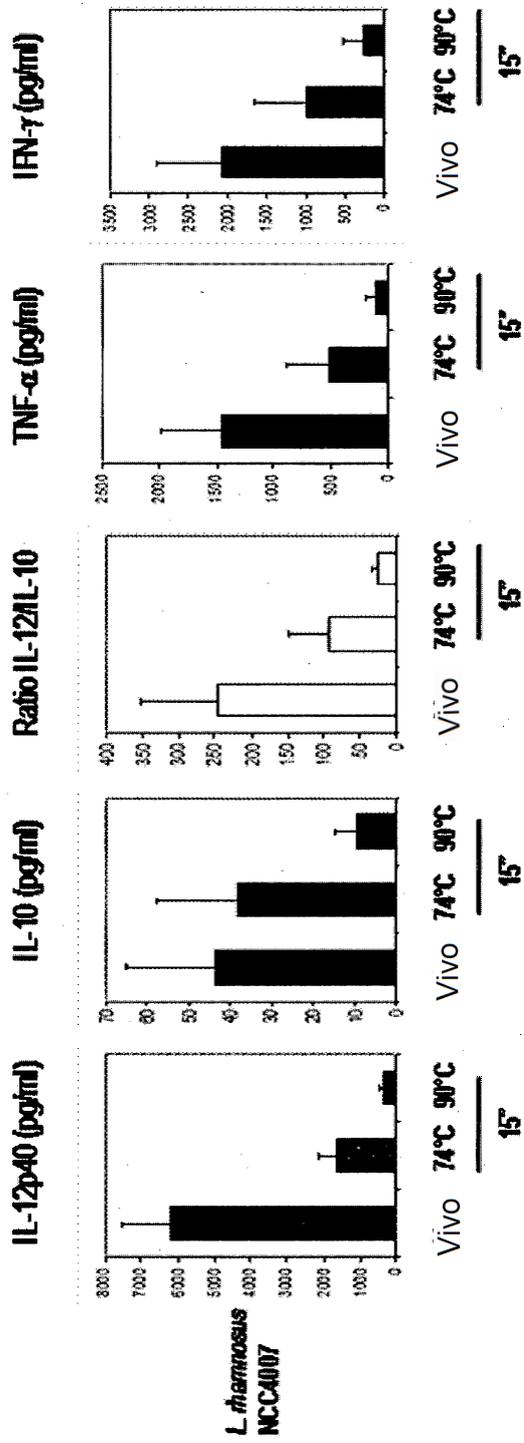


Figura 7

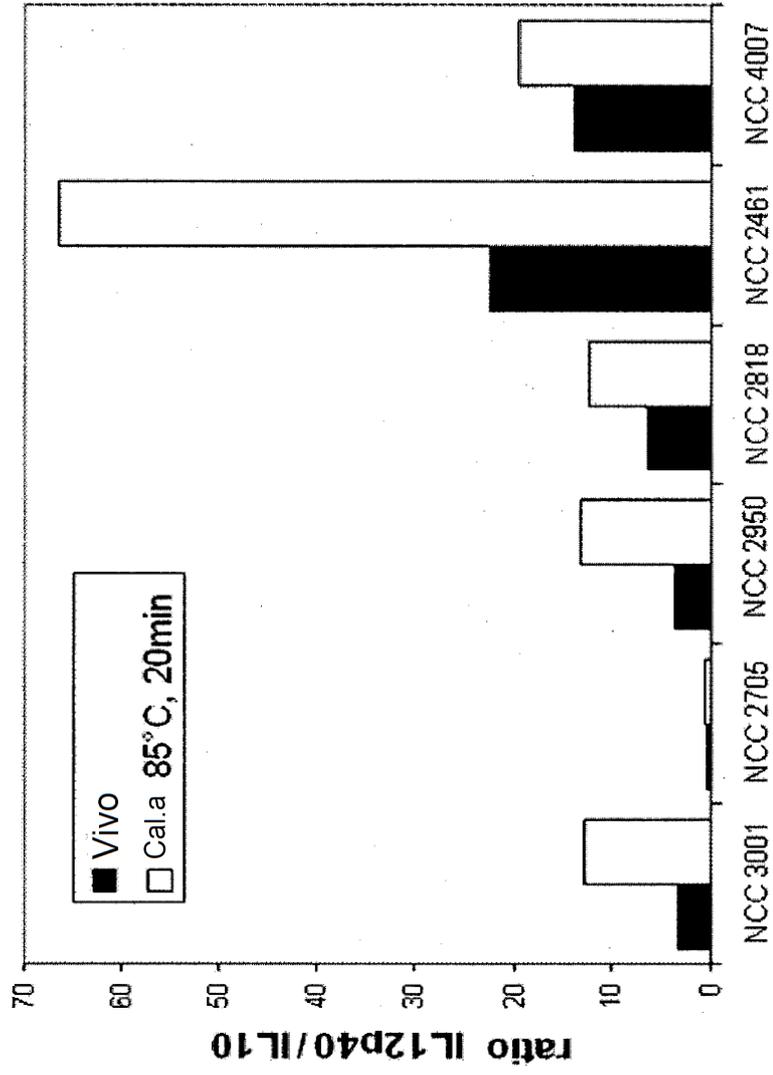


Figura 8

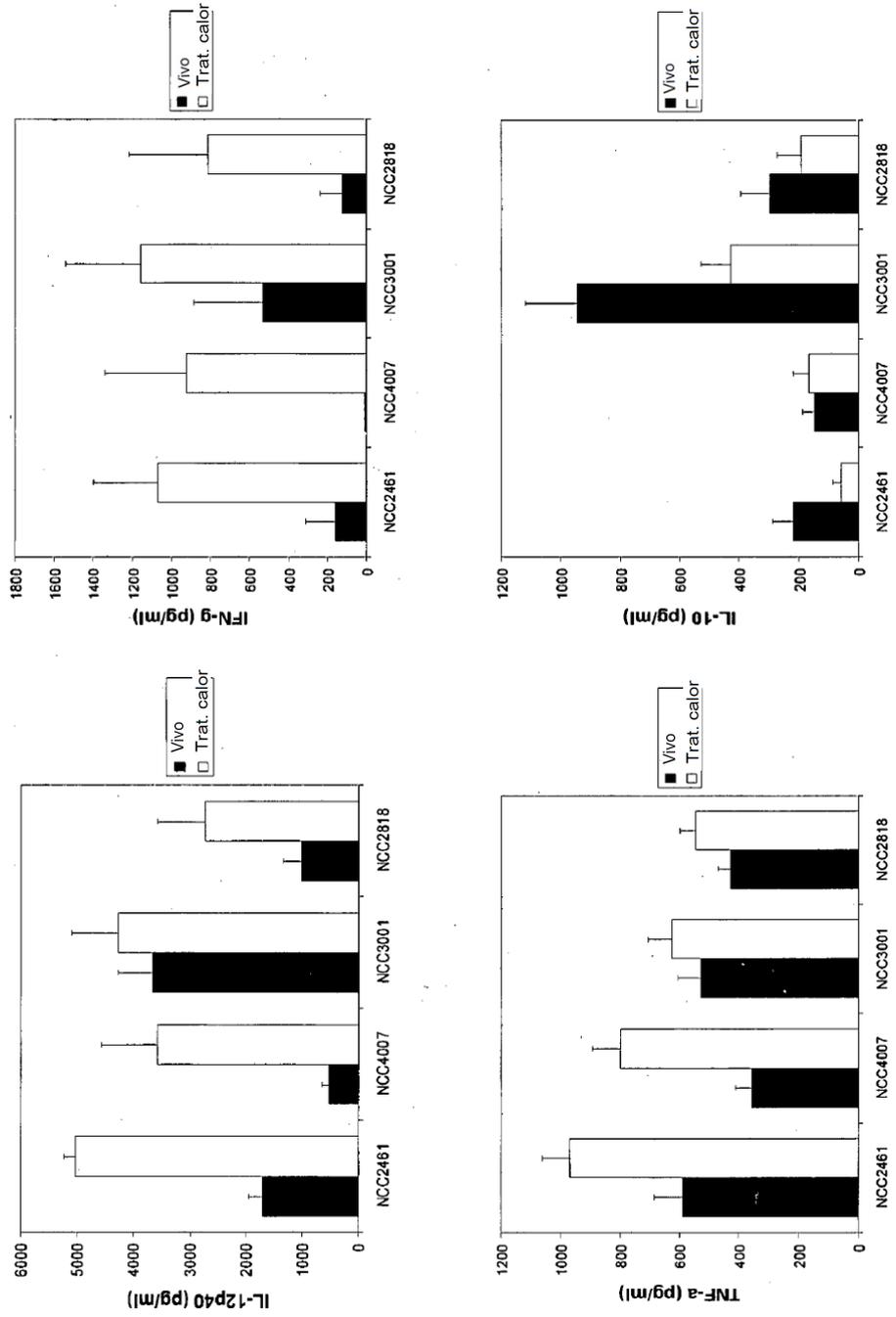


Figura 9

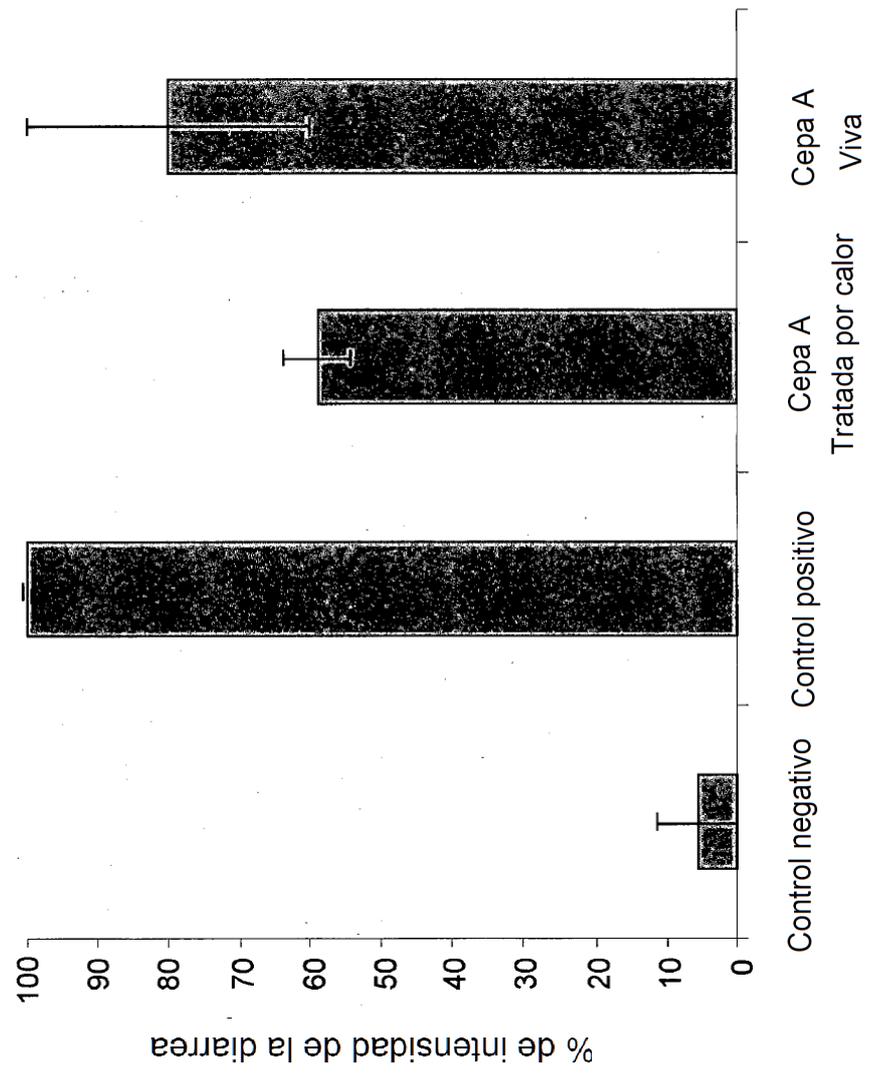


Figura 10

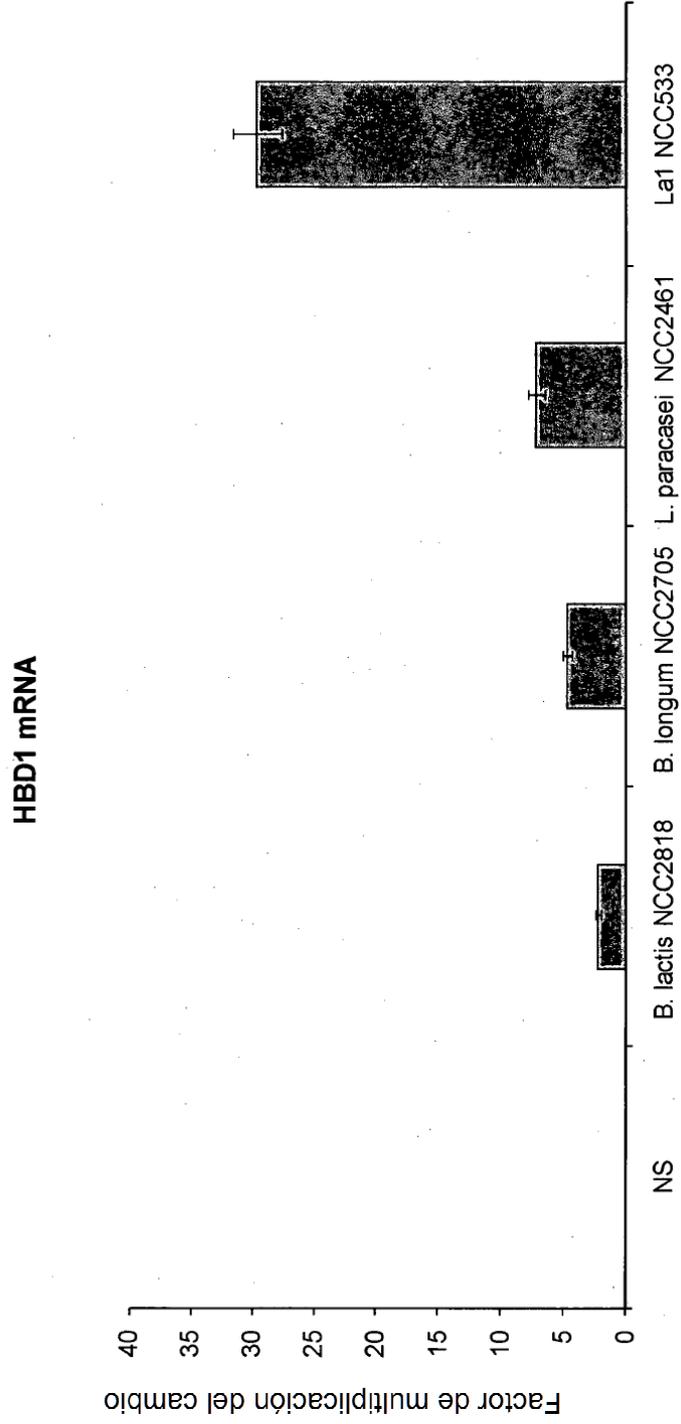


Figura 11

