

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 760**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 37/04** (2006.01)

**A61K 35/76** (2015.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010 E 10747837 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2429556**

54 Título: **Leches de crecimiento que contienen microorganismos probióticos**

30 Prioridad:

**11.05.2009 EP 09159925**

**11.05.2009 EP 09159929**

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

**02.06.2016**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)**

**Avenue Nestlé 55**

**1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**MERCENIER, ANNICK;**

**NUTTEN, SOPHIE y**

**PRIOULT, GUÉNOLÉE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 572 760 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**

Leches de crecimiento que contienen microorganismos probióticos

- 5 La presente invención se refiere al campo de la nutrición para bebés y niños pequeños. En particular la presente invención se refiere a leches de crecimiento que contienen microorganismos probióticos, para la alimentación de bebés y niños pequeños mayores de 10 meses. Estos microorganismos probióticos pueden ser de tipo no replicante, como, por ejemplo, los microorganismos probióticos bioactivos tratados térmicamente.
- 10 La leche materna es el alimento ideal para el crecimiento y desarrollo sano de los bebés. En 2001 la Organización mundial de la salud (OMS) cambió de 4 a 6 meses su recomendación sobre la duración de la lactancia materna exclusiva; por lo tanto la lactancia materna debería estimularse y promoverse conforme a ello.
- 15 A partir del 6º mes varía el comportamiento de los bebés. Por primera vez se sientan derechos o cogen un juguete con una sola mano. Los requerimientos nutricionales de un bebé cambian a medida que se desarrolla. Nutrientes tales como el hierro y el calcio son cada vez más importantes.
- 20 A partir de un año de edad las bebidas basadas en leche de vaca se convierten en un elemento importante en la dieta del niño, pero en sí la leche de vaca no se adapta a los requerimientos nutricionales de los niños pequeños. En concreto la leche de vaca contiene demasiada proteína, demasiados minerales, demasiado poco hierro, demasiados ácidos grasos saturados y no lleva suficientes grasas insaturadas.
- 25 Las leches de crecimiento (LC) se desarrollaron para ayudar a superar esta fase. La LC asegura una transición sostenida desde el bajo contenido proteico de la leche materna hasta el alto nivel de proteína presente en la leche de vaca y en los productos lácteos normales consumidos por los adultos.
- 30 La leche de crecimiento (LC) tiene la finalidad de ayudar a los niños más pequeños a maximizar su potencial de desarrollo físico y mental. La LC satisface las necesidades proteicas del niño sin sobrecargar su sistema metabólico todavía inmaduro.
- 35 Una función importante de la nutrición temprana de los bebés y los niños pequeños es la de generar una flora intestinal sana y desarrollar un sistema inmunitario fuerte.
- Una flora intestinal sana contribuirá a la funcionalidad del tracto GI, que a su vez ayudará a digerir correctamente la comida ingerida y reducirá el dolor de estómago en los bebés y en los niños pequeños.
- 40 Los bebés y los niños pequeños suelen tener unos 10 resfriados al año. Estos resfriados son molestos y pueden tener consecuencias más graves.
- Por lo tanto sería deseable mejorar aún más el efecto inmunopotenciador de las leches de crecimiento.
- También sería deseable mejorar aún más el efecto antiinflamatorio de las leches de crecimiento.
- 45 Por consiguiente en este campo hay necesidad de una leche de crecimiento que asegure una transición sostenida desde el bajo contenido proteico de la leche materna hasta el alto nivel de proteína presente en la leche de vaca. Tal tipo de leche de crecimiento debería tener un mejor efecto inmunopotenciador, un efecto antiinflamatorio y/o debería facilitar la digestión. Sería preferible que ello se pudiera conseguir usando ingredientes naturales administrables con seguridad, sin efectos secundarios, y fáciles de incorporar a las composiciones de leche de crecimiento mediante el uso de procedimientos industriales del estado técnico.
- 50 Los presentes inventores han abordado esta necesidad. Por lo tanto el objetivo de la presente invención era mejorar el estado técnico y proporcionar una composición de LC que satisficiera las necesidades arriba mencionadas.
- 55 Los presentes inventores se sorprendieron al ver que podían conseguir este objetivo de acuerdo con el contenido de la reivindicación independiente. Las reivindicaciones dependientes desarrollan más detalladamente la idea de la presente invención.
- 60 Conforme a ello los presentes inventores proponen la preparación de una composición de leche de crecimiento que contenga probióticos.
- 65 Las composiciones de leche de crecimiento son composiciones nutricionales. En particular las leches de crecimiento son composiciones nutricionales específicas cuya fórmula permite una transición sostenida desde la composición de la leche materna hasta la composición de la leche de vaca. Este ajuste se puede llevar a cabo gradualmente. Para seguir esta transición se pueden prever varias leches de crecimiento distintas. Por ejemplo, se puede administrar una composición de leche de crecimiento a la edad de 10 meses, una segunda composición de leche de crecimiento a partir de los 12 meses y una tercera composición de leche de crecimiento a partir de los 24 meses.

Se encontró que los probióticos podían aportar sus beneficios saludables en el marco de las leches de crecimiento. Asimismo, p.ej., en la leche materna hay bifidobacterias y éstas forman parte de lo que confiere a la leche materna sus propiedades protectoras naturales.

5 Por lo tanto, la adición de microorganismos probióticos a las fórmulas nutricionales para bebés y niños pequeños permitiría asemejarlas más estrechamente a la leche materna.

10 Sin embargo, como en el caso particular de las fórmulas en polvo que deben reconstituirse con agua, la vida útil de este tipo de leche es superior a la vida útil de p.ej. los yogures que contienen probióticos y éstos no suelen añadirse a dichas fórmulas por la incerteza de poder asegurar la viabilidad de los probióticos durante un periodo prolongado de vida útil, por ejemplo.

15 Ahora los presentes inventores han podido demostrar que los probióticos no replicantes también pueden aportar los beneficios saludables de los probióticos e incluso pueden tener mejores beneficios.

Por tanto la presente invención se refiere a una composición de leche de crecimiento que incluye microorganismos probióticos, para ser administrada a bebés o niños pequeños a partir de la edad de 10 meses.

20 La leche de crecimiento aporta la cantidad correcta de lípidos, con una composición equilibrada de ácidos grasos. Los lípidos son el mejor proveedor de la energía (9 kcal/g) necesaria para la creciente actividad del niño pequeño y además los ácidos grasos también se necesitan para formar las membranas celulares y son precursores importantes de algunos factores de acción fisiológica (como p.ej. hormonas, factores de coagulación, etc.).

25 Las normas de la FDA definen los bebés como personas de no más de 12 meses de edad (Título 21, Código de normas federales 21 CFR 105.3(e)).

La composición de leche de crecimiento de la presente invención lleva un contenido equilibrado de proteínas.

30 Por una parte se necesita proteína, sobre todo durante los periodos de crecimiento, p.ej. para la formación de tejidos corporales como los músculos. Por otra parte las cantidades elevadas de proteínas son una carga para la función renal aún inmadura del niño. Si la función renal no ha madurado, una ingesta elevada de proteínas puede poner en peligro la función renal. Los estudios apuntan a que los niños de más de un año de edad tienden a una ingesta de proteínas superior a las recomendaciones pediátricas. Una ingesta elevada de proteínas también se ha relacionado con la obesidad en la vida posterior.

35 La leche de vaca tiene una composición de ácidos grasos subóptima para la nutrición de bebés y niños pequeños. Alta en ácidos grasos saturados y baja ácidos grasos insaturados, la leche de vaca no proporciona la composición óptima y más saludable de ácidos grasos. Los ácidos grasos insaturados son necesarios para el crecimiento, p.ej. para la formación de células en el sistema nervioso, y los estudios demuestran que muchos niños pequeños no reciben los niveles recomendados. El cerebro, por ejemplo, es extremadamente rico en DHA (ácido graso insaturado n-3). Por lo tanto la composición de la leche de crecimiento de la presente invención tendría un buen balance entre las dos familias de ácidos grasos esenciales con una relación aproximadamente 4-10 entre ácidos grasos n-6 como el ácido linolénico y ácidos grasos n-3 como el ácido alfa-linolénico.

45 Si se suministra como composición seca, es preferible que la composición de la LC tenga una actividad acuosa inferior a 0,2, preferiblemente inferior a 0,15, para aumentar la estabilidad al almacenamiento. Por ejemplo, la mayor parte de las bacterias no crece cuando la actividad acuosa es inferior a 0,91 y la mayoría de los mohos deja de crecer cuando la actividad acuosa es inferior a 0,80.

50 La actividad acuosa ( $a_w$ ) es una medición del estado energético del agua en un sistema. Se define como la presión de vapor del agua dividida por la del agua pura. Por consiguiente el agua destilada tiene una presión de vapor de 1.

55 La composición de la leche de crecimiento de la presente invención tiene una densidad calórica comprendida en el intervalo de 70-80 kcal/100 ml y contiene una fuente proteica en una proporción de 2-3 g/100 kcal, una fuente de hidratos de carbono en una proporción de 12-15 g/100 kcal y una fuente de lípidos en una proporción de 3-4,6 g/100kcal.

60 Una composición de leche de crecimiento de la presente invención para administrar a bebés de 10-12 meses de edad tiene una densidad calórica aproximadamente igual a 70 kcal/100 ml y contiene una fuente proteica en una proporción de 2,2-2,3 g/100 kcal, una fuente de carbohidratos en una proporción de 13 g/100 kcal aproximadamente y una fuente de lípidos en una proporción de 4,3 a 4,4 g/100kcal.

65 Una composición de leche de crecimiento de la presente invención para administrar a niños de 12-24 meses de edad tiene una densidad calórica comprendida aproximadamente en el intervalo de 70-80 kcal/100 ml y contiene una fuente proteica en una proporción de 2,2-2,9 g/100 kcal, una fuente de hidratos de carbono en una proporción de 11,9-13,9 g/100 kcal aproximadamente y una fuente de lípidos en una proporción de 3,9 a 4,6 g/100kcal.

Una composición de leche de crecimiento de la presente invención para administrar a niños de más de 24 meses de edad tiene una densidad calórica de 70 kcal/100 ml aproximadamente y comprende una fuente proteica en una proporción de 2,5 g/100 kcal aproximadamente, una fuente de carbohidratos en una proporción de 14,6 g/100 kcal aproximadamente y una fuente de lípidos en una proporción de 3,9 a 4,6 g/100kcal.

La fuente proteica puede constar de proteínas de suero de leche y caseína. Por ejemplo, se puede usar una relación suero de leche a caseína comprendida en el intervalo de 20:80 a 80:20 aproximadamente, p.ej. de 40:60 a 60:40.

La fuente de hidratos de carbono puede constar esencialmente de lactosa. No obstante también se pueden usar proporciones de lactosa y maltodextrina en el intervalo de 3:1 hasta 1:1, por ejemplo.

La fórmula alimenticia de la presente invención puede contener 0,2-0,3 g de AGPI-CL/100g de ácidos grasos. Los AGPI-CL se pueden elegir entre ARA, DHA y sus combinaciones. Por ejemplo, el AGPI-CL puede comprender una combinación de ARA y DHA. Se ha demostrado que las fórmulas que llevan ARA y DHA proporcionan un desarrollo visual y mental similar al del niño alimentado con leche materna.

La fórmula alimenticia de la presente invención también puede contener 1,5-2,5 mg de nucleótidos por 100 ml de fórmula. Los nucleótidos y sus bases no se consideran "esenciales" porque pueden ser sintetizados por el cuerpo del niño a partir de compuestos más simples. Sin embargo hay momentos en que los procesos de síntesis pueden ser incapaces de satisfacer la demanda, por ejemplo durante los periodos de rápida renovación celular, como ocurre en el crecimiento normal o en las afecciones intestinales. En estos momentos el cuerpo depende más fuertemente de las fuentes dietéticas de nucleótidos.

La composición contiene microorganismos probióticos, incluyendo microorganismos probióticos no replicantes, al menos en un 90%, que son de *Bifidobacterium breve* NCC 2950.

Los presentes inventores se sorprendieron al ver que, p.ej. en lo referente al efecto inmunopotenciador y/o al efecto antiinflamatorio, los microorganismos probióticos no replicantes podían ser más efectivos que los microorganismos probióticos replicantes.

Esto es sorprendente porque los probióticos suelen definirse como "microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios de salud al huésped" (directrices de la FAO/OMS). La amplia mayoría de literatura publicada trata de probióticos vivos. Además varios estudios han investigado los beneficios de salud que aportan las bacterias no replicantes y la mayoría de ellos han indicado que la inactivación de los probióticos, p.ej. mediante tratamiento térmico, produce una pérdida de su supuesto beneficio saludable (Rachmilewitz, D., y otros, 2004, *Gastroenterology* 126:520-528; Castagliuolo, y otros, 2005, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43:197-204; Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, *Br. J. Nutr.* 86:285-289; Kaila, M., y otros, 1995, *Arch. Dis. Child* 72:51-53.). Algunos estudios han demostrado que los probióticos muertos pueden retener ciertos efectos saludables (Rachmilewitz, D., y otros, 2004, *Gastroenterology* 126:520-528; Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, *Br. J. Nutr.* 86:285-289), pero en el estado técnico los probióticos vivos se han considerado claramente más efectivos.

La composición según la presente invención puede contener microorganismos probióticos en cualquier cantidad efectiva, por ejemplo en una proporción correspondiente a  $10^6$  hasta  $10^{12}$  ufc/g de peso seco aproximadamente.

Los microorganismos probióticos son microorganismos probióticos no replicantes.

Los microorganismos probióticos "no replicantes" incluyen bacterias probióticas que han sido tratadas térmicamente, incluyendo microorganismos inactivados, muertos, no viables y/o presentes en forma de fragmentos tales como ADN, metabolitos, compuestos citoplasmáticos y/o materiales de pared celular.

"No replicante" significa que por los métodos clásicos de cultivo en placa no se pueden detectar células no viables ni unidades formadoras de colonias. Dichos métodos clásicos de cultivo en placa están compendiados en el libro de microbiología: James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden. 2005. *Modern food microbiology*. 7ª edición, Springer Science, Nueva York, N.Y. 790 p. La ausencia de células viables se puede demostrar del modo siguiente: ausencia de colonias visibles en las placas de agar o ningún incremento de turbidez en el medio líquido de cultivo después de inocular preparaciones bacterianas a distintas concentraciones (muestras "no replicantes") e incubarlas en condiciones apropiadas (atmósfera aeróbica y/o anaeróbica durante al menos 24 h).

Para los fines de la presente invención los probióticos se definen como "preparaciones celulares microbianas o componentes de células microbianas con efecto beneficioso en la salud o el bienestar del huésped" (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. y otros "Probiotics: how should they be defined" [*Probióticos: cómo deberían definirse*] *Trends Food Sci. Technol.* 1999:10 107-10).

La posibilidad de emplear microorganismos probióticos no replicantes ofrece varias ventajas. En niños gravemente inmunodeprimidos el uso de probióticos vivos puede estar limitado a casos excepcionales por el posible riesgo de desarrollar bacteremia. En cambio los probióticos no replicantes se pueden utilizar sin ningún problema.

Además la provisión de microorganismos probióticos no replicantes permite la reconstitución en caliente, a la vez que conserva el beneficio para la salud.

5 Las composiciones de la presente invención contienen microorganismos probióticos no replicantes en cantidad suficiente para producir un beneficio para la salud, al menos parcialmente. Una cantidad adecuada para lograrlo se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para tal fin dependerán de varios factores conocidos de los especialistas en la materia, tales como el peso y el estado general de salud del niño, así como del efecto en la matriz alimentaria.

10 En las aplicaciones profilácticas, las composiciones según la presente invención se administran a un consumidor susceptible o en riesgo de padecer un trastorno, en cantidad suficiente para reducir, al menos parcialmente, el riesgo de desarrollar este trastorno. Dicha cantidad se define como "dosis profilácticamente efectiva". También en este caso las cantidades precisas dependen de varios factores, tales como el estado general de salud y el peso del niño, así como del efecto en la matriz alimentaria.

15 Los especialistas en la materia podrán ajustar convenientemente la dosis terapéuticamente efectiva y/o la dosis profilácticamente efectiva.

20 En general la composición de la presente invención contiene microorganismos probióticos no replicantes en una dosis terapéuticamente efectiva y/o en una dosis profilácticamente efectiva.

Normalmente la dosis terapéuticamente efectiva y/o la dosis profilácticamente efectiva está comprendida en el intervalo aproximado de 0,005 mg - 1000 mg de microorganismos probióticos y/o microorganismos probióticos no replicantes por dosis diaria.

25 Por lo que se refiere a proporciones numéricas, el contenido en la composición de microorganismos no replicantes tratados "brevemente a alta temperatura" puede estar comprendido entre el equivalente a  $10^4$  hasta  $10^{12}$  ufc/g de composición seca. Evidentemente los microorganismos no replicantes no forman colonias; por lo tanto este dato debe entenderse como la cantidad de microorganismos no replicantes que se obtiene partiendo de  $10^4$  y  $10^{12}$  ufc/g de bacterias replicantes, incluyendo microorganismos inactivados, no viables o muertos, o presentes en forma de fragmentos tales como ADN o compuestos de la pared celular o citoplasmáticos. En otras palabras, la cantidad de microorganismos que contiene la composición se expresa como la capacidad formadora de colonias (ufc) de esta cantidad de microorganismos, como si todos ellos estuvieran vivos, independientemente del hecho de no ser replicantes, como en el caso de estar inactivados o muertos, fragmentados o formando una mezcla de cualquiera de todos estos estados o de todos ellos.

40 Los microorganismos no replicantes están presentes preferiblemente en una cantidad equivalente a la comprendida entre  $10^4$  y  $10^9$  ufc/g de composición seca, con mayor preferencia en una cantidad equivalente a la comprendida entre  $10^5$  y  $10^9$  ufc/g de composición seca.

Los probióticos se pueden hacer no replicantes por cualquier método conocido del estado técnico.

45 Las tecnologías disponibles hoy en día para que las cepas probióticas resulten no replicantes son normalmente el tratamiento térmico, la irradiación con rayos y o luz UV o el uso de agentes químicos (formalina, paraformaldehído).

Para transformar los probióticos en no replicantes se preferiría usar una técnica relativamente fácil de aplicar en las condiciones productivas de la industria alimentaria.

50 La mayor parte de los productos existentes actualmente en el mercado contienen probióticos que han sido tratados térmicamente durante su producción. Por consiguiente sería conveniente poder tratar térmicamente los probióticos junto con el producto elaborado o al menos de forma similar, de manera que los probióticos retuvieran o mejoraran sus propiedades beneficiosas o incluso adquirieran una nueva característica beneficiosa para el consumidor.

55 Sin embargo la inactivación de los microorganismos probióticos mediante tratamientos térmicos suele relacionarse en la literatura con una pérdida, al menos parcial, de su actividad probiótica.

Ahora los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la transformación de los microorganismos probióticos en no replicantes, p.ej. mediante tratamiento térmico, no causa la pérdida de sus beneficios saludables, sino que al contrario puede potenciar los ya existentes e incluso generar nuevos beneficios para la salud.

60 Por tanto una forma de ejecución de la presente invención es una composición en la cual los microorganismos probióticos no replicantes fueron transformados en tales mediante un tratamiento térmico.

Este tratamiento térmico se puede realizar a 71,5°C, como mínimo, durante al menos 1 segundo.

65 Se pueden aplicar tratamientos térmicos de larga o corta duración.

A escala industrial se prefieren actualmente tratamientos térmicos de corta duración como los de tipo UHT. Esta clase de tratamiento térmico reduce las cargas bacterianas y rebaja el tiempo de proceso, y por lo tanto disminuye el deterioro de los nutrientes.

5 Los presentes inventores demuestran por primera vez que los microorganismos probióticos tratados térmicamente a temperaturas elevadas durante breves periodos de tiempo muestran unos perfiles inmunitarios antiinflamatorios con independencia de sus propiedades originales. En particular, con este tratamiento térmico se desarrolla un nuevo perfil antiinflamatorio o se potencia un perfil antiinflamatorio ya existente.

10 Por consiguiente, ahora se pueden generar microorganismos probióticos no replicantes con perfiles inmunitarios antiinflamatorios usando parámetros específicos de tratamiento térmico que corresponden a los típicos tratamientos térmicos aplicables en la industria, aunque los homólogos vivos no sean cepas antiinflamatorias.

15 Así pues, por ejemplo, el tratamiento térmico se puede efectuar a una temperatura elevada de aproximadamente 71,5-150°C durante aproximadamente 1-120 segundos. El tratamiento a temperatura alta puede ser un tratamiento de temperatura elevada/tiempo breve (HTST) o un tratamiento a temperatura ultra elevada (UHT).

20 Los microorganismos probióticos se pueden someter a un tratamiento a temperatura elevada de aproximadamente 71,5-150°C durante un breve tiempo de 1-120 segundos aproximadamente.

25 Los microorganismos se pueden someter con mayor preferencia a un tratamiento a alta temperatura de 90 – 140°C aproximadamente, por ejemplo de 90° - 120°C, durante un breve tiempo de unos 1-30 segundos.

Este tratamiento a temperatura elevada convierte los microorganismos en no replicantes, al menos en parte.

30 El tratamiento a temperatura elevada se puede efectuar a la presión atmosférica normal y también a alta presión. Los márgenes típicos de presión varían entre 1 y 50 bar, preferiblemente entre 1 y 10 bar y con mayor preferencia entre 2 y 5 bar. Evidentemente es preferible realizar el tratamiento térmico de los probióticos en un medio que sea líquido o sólido al aplicar el calor. Por lo tanto la presión ideal que deba aplicarse dependerá de la naturaleza de la composición en la cual se preparan los microorganismos y de la temperatura empleada.

35 El tratamiento a alta temperatura se puede efectuar en el intervalo de temperatura de 71,5-150°C aproximadamente, preferiblemente a unos 90-120°C, con mayor preferencia a unos 120-140°C.

40 El tratamiento a alta temperatura se puede efectuar durante un breve tiempo de 1-120 segundos aproximadamente, con preferencia de 1-30 segundos aproximadamente, con mayor preferencia de 5-15 segundos aproximadamente.

Este marco de tiempo prefijado se refiere al tiempo durante el cual los microorganismos probióticos están sometidos a la temperatura indicada. Obsérvese que el tiempo de aplicación de calor puede diferir en función de la naturaleza y cantidad de la composición que aporta los microorganismos y de la estructura del aparato calentador utilizado.

45 No obstante la composición de la presente invención y/o los microorganismos suelen someterse a un tratamiento de alta temperatura por breve tiempo (HTST), a una pasteurización instantánea o a un tratamiento de temperatura ultra elevada (UHT).

50 Un tratamiento UHT es un proceso a temperatura ultra elevada o un tratamiento ultra-térmico (ambos abreviados UHT) que conlleva la esterilización al menos parcial de una composición, calentándola durante un tiempo breve, de 1-10 segundos aproximadamente, a una temperatura superior a 135°C (275°F), que es la temperatura necesaria para matar las esporas bacterianas en la leche. Por ejemplo, este modo de procesar la leche, usando temperaturas superiores a 135°C, permite reducir la carga bacteriana en el tiempo de ocupación necesario (2-5 s), lo cual facilita la operación en continuo.

55 Hay dos tipos principales de sistemas UHT: los sistemas directos e indirectos. En el sistema directo los productos se tratan por inyección o infusión de vapor, mientras que en el sistema indirecto se tratan térmicamente utilizando un intercambiador de calor de placas, un intercambiador de calor tubular o un intercambiador de calor de superficie raspada. En cualquiera o varias etapas del proceso de preparación del producto se pueden usar combinaciones de sistemas UHT.

60 Un tratamiento HTST se define del modo siguiente (temperatura elevada/tiempo breve): método de pasteurización ideado para lograr una reducción logarítmica 5, matando el 99,9999% del número de microorganismos viables en la leche, lo cual se considera eficaz para destruir prácticamente todas las levaduras, mohos y bacterias putrefactoras corrientes, y además asegura la destrucción adecuada de los organismos patógenos comunes resistentes al calor. En el proceso HTST la leche se calienta a 71,7°C (161°F) durante 15-20 segundos.

65 La pasteurización instantánea es un método de pasteurización térmica de bebidas perecederas como los zumos de frutas y verduras, la cerveza y los productos lácteos. Se realiza antes del envasado a fin de matar microorganismos

putrefactores, hacer los productos más seguros y prolongar su duración. El líquido se mueve siguiendo un flujo continuo y controlado mientras es sometido a temperaturas de 71,5°C (160°F) hasta 74°C (165°F) durante 15 a 30 segundos aproximadamente.

5 Para los fines de la presente invención la expresión "tratamiento breve a alta temperatura" incluye los tratamientos de temperatura elevada durante un corto tiempo (HTST), los tratamientos UHT y la pasteurización instantánea, por ejemplo.

10 Como este tipo de tratamiento térmico produce probióticos no replicantes con un perfil antiinflamatorio mejorado, la composición de la presente invención se puede usar para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias.

15 No hay ninguna limitación especial de las enfermedades inflamatorias que se pueden tratar o prevenir mediante la composición de la presente invención. Por ejemplo, se pueden seleccionar del grupo formado por inflamaciones agudas tales como sepsis; quemaduras; e inflamaciones crónicas como la enfermedad inflamatoria intestinal, p.ej. la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la bolsitis; enterocolitis necrosantes; inflamaciones de la piel, como las provocadas por UV o sustancias químicas, eczemas, piel reactiva; síndrome del intestino irritable; inflamaciones oculares; alergia, asma; y combinaciones de las mismas.

20 Si se usan tratamientos térmicos de larga duración para hacer que los microorganismos probióticos se vuelvan no replicantes, el tratamiento térmico se puede efectuar en el intervalo de temperatura comprendido aproximadamente entre 70-150°C durante unos 3 minutos hasta 2 horas, preferiblemente en el intervalo de 80-140°C durante 5 hasta 40 minutos.

25 Aunque el estado técnico indica en general que las bacterias transformadas en no replicantes mediante tratamientos térmicos de larga duración suelen ser menos eficientes que las células vivas al ejercer sus propiedades probióticas, los presentes inventores han podido demostrar que los probióticos tratados térmicamente son superiores a sus homólogos vivos en la estimulación del sistema inmunitario.

30 La presente invención también se refiere a una composición que contiene microorganismos probióticos convertidos en no replicantes mediante un tratamiento térmico a por lo menos 70°C, aproximadamente, durante al menos 3 minutos aproximadamente.

35 Los efectos potenciadores del sistema inmunitario por los probióticos no replicantes han sido confirmados mediante perfilado inmunológico *in vitro*. El modelo *in vitro* aplicado se basa en el perfilado de citocinas procedentes de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana y está bien aceptado en el estado técnico como modelo estándar para los ensayos de compuestos inmunomoduladores (Schultz y otros, 2003, Journal of Dairy Research 70, 165-173; Taylor y otros, 2006, Clinical and Experimental Allergy, 36, 1227-1235; Kekkonen y otros, 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192-1203).

40 El ensayo *in vitro* de CMSP ha sido utilizado por varios autores/equipos de investigación, por ejemplo para clasificar los probióticos según su perfil inmunológico, es decir sus características anti- o proinflamatorias (Kekkonen y otros, 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192-1203). Por ejemplo, se ha demostrado que este ensayo permite predecir un efecto antiinflamatorio de los probióticos propuestos en modelos murinos de colitis intestinal (Foligne, B. y otros, 2007, World J. Gastroenterol. 13: 236-243). Este ensayo se utiliza asimismo de manera habitual como lectura en ensayos clínicos y se ha demostrado que produce resultados coherentes con los resultados clínicos (Schultz y otros, 2003, Journal of Dairy Research 70, 165-173; Taylor y otros, 2006, Clinical and Experimental Allergy, 36, 1227-1235).

50 Las enfermedades alérgicas han ido aumentando durante las últimas décadas y actualmente son consideradas epidémicas por la OMS. En general la alergia se considera el resultado de un desequilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 del sistema inmunitario que da lugar a una fuerte tendencia hacia la producción de mediadores Th2. Por lo tanto la alergia se puede mitigar, regular a la baja o prevenir, restableciendo un equilibrio adecuado entre los brazos Th1 y Th2 del sistema inmunitario. Esto implica la necesidad de reducir las respuestas Th2 o potenciar, por lo menos temporalmente, las respuestas Th1. Las últimas serían características de una respuesta inmunitaria potenciada, que por ejemplo suele ir acompañada de unos mayores niveles de IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (Kekkonen y otros, 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192-1203; Viljanen M. y otros, 2005, Allergy, 60, 494-500).

60 Por tanto la composición de la presente invención permite tratar o prevenir trastornos relacionados con una defensa inmunitaria comprometida.

65 Por consiguiente los trastornos relacionados con una defensa inmunitaria comprometida que se pueden tratar o prevenir mediante la composición de la presente invención no están especialmente limitados.

Por ejemplo, se pueden seleccionar del grupo formado por infecciones, en particular bacterianas, víricas, fúngicas y/o parasitarias; carencias de fagocitos; niveles bajos hasta graves de inmunodepresión, como los inducidos por

estrés o por fármacos inmunodepresores, quimioterapia o radioterapia; estados naturales de sistemas inmunitarios menos inmunocompetentes, como los de los neonatos; alergias; y combinaciones de ellos.

5 La composición descrita en la presente invención también permite potenciar la respuesta infantil a las vacunas, en particular a las vacunas orales.

Cualquier proporción de microorganismos no replicantes será efectiva. No obstante, en general se prefiere que al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, con mayor preferencia al menos el 98%, sobre todo al menos el 99%, idealmente al menos el 99,9 % y en el caso más ideal todos los probióticos sean no replicantes.

10 En una forma de ejecución de la presente invención todos los microorganismos son no replicantes.

Por consiguiente en la composición de la presente invención al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95%, con mayor preferencia al menos el 98%, sobre todo al menos el 99%, idealmente al menos el 99,9 % y en el caso más ideal todos los probióticos pueden ser no replicantes.

15 Todos los microorganismos probióticos se pueden usar para los fines de la presente invención.

20 Por ejemplo, los microorganismos probióticos se pueden elegir del grupo formado por bifidobacterias, lactobacilos, bacterias propiónicas o combinaciones de ellas, por ejemplo *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 diacetyllactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y/o mezclas de ellas.

25 La composición conforme a la presente invención comprende *Bifidobacterium breve* NCC 2950 no replicante.

Todas estas cepas fueron depositadas según el tratado de Budapest y/o estaban disponibles en el comercio.

30 Las cepas han sido depositadas según el tratado de Budapest del modo siguiente:

Bifidobacterium longum NCC 3001:	ATCC BAA-999
Bifidobacterium longum NCC 2705:	CNCM I-2618
35 Bifidobacterium breve NCC 2950:	CNCM I-3865
Bifidobacterium lactis NCC 2818:	CNCM I-3446
Lactobacillus paracasei NCC 2461:	CNCM I-2116
Lactobacillus rhamnosus NCC 4007:	CGMCC 1.3724
40 Streptococcus themophilus NCC 2019:	CNCM I-1422
Streptococcus themophilus NCC 2059:	CNCM I-4153
Lactococcus lactis NCC 2287:	CNCM I-4154
Lactobacillus casei NCC 4006:	CNCM I-1518
Lactobacillus casei NCC 1825:	ACA-DC 6002
45 Lactobacillus acidophilus NCC 3009:	ATCC 700396
Lactobacillus bulgaricus NCC 15:	CNCM I-1198
Lactobacillus johnsonii La1:	CNCM I-1225
Lactobacillus reuteri DSM17938:	DSM17938
Lactobacillus reuteri ATCC55730:	ATCC55730
50 Escherichia coli Nissle 1917:	DSM 6601

Los especialistas en la materia entenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención aquí descritas sin apartarse de su alcance, tal como está revelado.

55 De los siguientes ejemplos y figuras se desprenden otras ventajas y características de la presente invención.

Las figuras 1 A y B representan la intensificación de los perfiles inmunitarios antiinflamatorios de los probióticos sometidos a tratamientos de "temperatura elevada por breve tiempo".

60 La figura 2 representa cepas probióticas no antiinflamatorias que resultan antiinflamatorias, es decir que muestran *in vitro* unos perfiles inmunitarios antiinflamatorios pronunciados, tras ser sometidas a tratamientos de "temperatura elevada por breve tiempo".

65 Las figuras 3 A y B representan cepas probióticas usadas en productos comercialmente disponibles que muestran *in vitro* unos perfiles inmunitarios antiinflamatorios intensificados o nuevos, después de ser sometidas a tratamientos de "temperatura elevada por breve tiempo".

Las figuras 4 A y B representan cepas iniciadoras lácteas (es decir, cepas iniciadoras Lc1) que muestran *in vitro* unos perfiles inmunitarios antiinflamatorios intensificados o nuevos, después de ser sometidas a tratamiento térmico a elevadas temperaturas.

5 La figura 5 representa una cepa probiótica no antiinflamatoria que muestran *in vitro* unos perfiles inmunitarios antiinflamatorios tras ser sometida a tratamientos HTST.

10 Figura 6: análisis de componentes principales de los datos de CMSP (IL-12p40, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10) generados con cepas probióticas y cepas iniciadoras lácteas en sus formas vivas y tratadas térmicamente (140°C durante 15 segundos). Cada punto representa una cepa viva o tratada térmicamente, identificada por su número NCC o por su nombre.

15 La figura 7 representa las relaciones IL-12p40 / IL-10 ratios de cepas vivas y tratadas térmicamente (85°C, 20 min). En general el tratamiento térmico a 85°C durante 20 minutos produce un aumento de las relaciones IL-12p40 / IL-10 al contrario que los tratamientos a "temperatura elevada por breve tiempo" de la presente invención (figuras 1, 2, 3, 4 y 5).

20 La figura 8 representa la intensificación *in vitro* de la secreción de citocinas a partir de CMSP humanas estimuladas con bacterias tratadas térmicamente.

25 La figura 9 representa el porcentaje de la intensidad de las diarreas observadas en ratones sensibilizados con OVA y estimulados con solución salina (control negativo), en ratones sensibilizados con OVA y estimulados con OVA (control positivo), y en ratones sensibilizados con OVA y sensibilizados con OVA y tratados con *Bifidobacterium breve* NCC2950 vivo o sometido a tratamiento térmico. Los resultados están representados como porcentaje de la intensidad de las diarreas (media  $\pm$  ESM, calculada a partir de 4 ensayos independientes), de modo que el 100% de intensidad de la diarrea corresponde a los síntomas desarrollados en el grupo de control positivo (sensibilizado y estimulado con el alérgeno).

30 Ejemplo 1:

Metodología

Preparaciones bacterianas:

35 Los beneficios saludables que los probióticos vivos proporcionan al sistema inmunitario del huésped se consideran generalmente específicos de la cepa. Se ha demostrado que los probióticos inductores de altos niveles de IL-10 y/o de bajos niveles de citocinas proinflamatorias *in vitro* (ensayo CMSP) son potentes cepas antiinflamatorias *in vivo* (Foligné, B. y otros, 2007, World J. Gastroenterol. 13:236-243).

40 Para investigar las propiedades antiinflamatorias de los probióticos térmicamente tratados se usaron varias cepas de probióticos. Éstas fueron *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. Asimismo se ensayaron varias cepas iniciadoras de cultivos, incluyendo algunas cepas utilizadas comercialmente para producir productos Nestlé fermentados con Lc1: *Streptococcus thermophilus* NCC 2019, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059, *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15 y *Lactococcus lactis* NCC 2287.

50 Las células bacterianas se cultivaron en condiciones optimizadas para cada cepa en biorreactores de 5-15 l. Se pueden usar todos los medios de cultivo típicamente bacterianos. Estos medios son conocidos de los especialistas en la materia. Cuando el pH estuvo ajustado a 5,5 se añadió continuamente solución básica al 30% (de NaOH o Ca(OH)<sub>2</sub>). En caso necesario las condiciones anaeróbicas se mantuvieron pasando CO<sub>2</sub> por el espacio de cabeza. La *E. coli* se cultivó en condiciones anaeróbicas estándar.

55 Las células bacterianas se recogieron por centrifugación (5.000 x g, 4°C) y se resuspendieron en volúmenes idóneos de solución salina tamponada con fosfato (PBS), con el fin de alcanzar una concentración final de 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> ufc/ml aproximadamente. Una parte de la preparación se congeló a -80°C con 15% de glicerina. Otra parte de células se trató térmicamente a:

- 60
- Temperatura ultra elevada: 140°C durante 15 segundos, por inyección directa de vapor.
  - Temperatura alta por breve tiempo (HTST): 74°C, 90°C y 120°C durante 15 segundos, por inyección directa de vapor.
  - Temperatura baja durante largo tiempo (85°C, 20 min) en baño de agua.

65 Después del tratamiento térmico las muestras se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su uso.

Perfilado inmunológico *in vitro* de las preparaciones bacterianas:

Se determinaron los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas vivas y tratadas térmicamente (es decir la capacidad de inducir la secreción *in vitro* de citocinas específicas de células sanguíneas humanas). Las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) humana se aislaron de los filtros sanguíneos. Tras la separación por gradiente de densidad celular, las células mononucleares se recogieron y se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank. Después las células se resuspendieron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (MDMI, de Sigma) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Bioconcept, Paris, Francia), L-glutamina al 1% (Sigma), penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma) y gentamicina al 0,1% (Sigma). Luego las CMSP ( $7 \times 10^5$  células/pocillo) se incubaron con bacterias vivas y tratadas térmicamente (el equivalente a  $7 \times 10^6$  ufc/pocillo) en placas de 48 pocillos durante 36 h. Los efectos de las bacterias vivas y tratadas térmicamente se ensayaron con CMSP de 8 donantes individuales divididos en dos experimentos separados. Tras 36 h de incubación las placas de cultivo se congelaron y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la medición de las citocinas. El perfilado de citocinas se realizó en paralelo (es decir en el mismo ensayo y con el mismo lote de CMSP) para las bacterias vivas y sus homólogas tratadas térmicamente.

Los niveles de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-12p40, TNF- $\alpha$  e IL-10) en los sobrenadantes de los cultivos celulares tras 36 h de incubación se determinaron por ELISA (R&D DuoSet Human IL-10, BD OptEIA Human IL12p40, BD OptEIA Human TNF $\alpha$ , BD OptEIA Human IFN- $\gamma$ ) según las instrucciones del fabricante. Las IFN- $\gamma$ , IL-12p40 y TNF- $\alpha$  son citocinas proinflamatorias, mientras que la IL-10 es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados están expresados como medias (pg/ml)  $\pm$  ESM de 4 donantes individuales y son representativos de dos ensayos separados realizados respectivamente con 4 donantes. La relación IL-12p40 / IL-10 se calcula para cada cepa como un valor predictivo del efecto antiinflamatorio *in vivo* (Foligné, B. y otros, 2007, World J.Gastroenterol. 13:236-243).

Los valores numéricos de las citocinas (pg/ml) obtenidos por ELISA (véase arriba) para cada cepa se introdujeron en el programa BioNumerics v5.10 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Esta serie de datos se sometió a un análisis de componentes principales (ACP, técnica de dimensionado). En este análisis se incluyó la sustracción de los valores medios y la división por las varianzas a lo largo de las características.

Resultados

Perfiles antiinflamatorios generados por tratamientos del tipo temperatura ultra elevada (UHT) / temperatura elevada por breve tiempo (HTST)

Las cepas probióticas investigadas se sometieron a una serie de tratamientos térmicos (a temperatura ultra elevada (UHT), a temperatura elevada por breve tiempo (HTST) y a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 20 min) y sus perfiles inmunológicos se compararon con los de las células vivas *in vitro*. Los microorganismos vivos (probióticos y/o fermentos lácticos) indujeron distintos niveles de producción de citocinas al incubarlos con CMSP humanas (figuras 1, 2, 3, 4 y 5). El tratamiento térmico de estos microorganismos modificó los niveles de citocinas producidas por las CMSP en función de la temperatura. Los tratamientos a "temperatura elevada por breve tiempo" ( $120^{\circ}\text{C}$  o  $140^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos) generaron bacterias no replicantes con perfiles inmunológicos antiinflamatorios (figuras 1, 2, 3 y 4). De hecho las cepas sometidas a un tratamiento del tipo UHT ( $140^{\circ}\text{C}$ , 15 segundos) indujeron menos citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p40) manteniendo o induciendo la producción adicional de IL-10 (en comparación con sus homólogas vivas). Las relaciones de IL-12p40 / IL-10 resultantes fueron inferiores para cualquier cepa sometida a un tratamiento tipo UHT, en comparación con las células vivas (figuras 1, 2, 3 y 4). Esta observación también fue válida para las bacterias sometidas a tratamientos del tipo HTST, es decir a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos (figuras 1, 2, 3 y 4) o a  $74^{\circ}\text{C}$  y a  $90^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos (figura 5). Los tratamientos térmicos (del tipo UHT o HTST) tuvieron un efecto similar en los perfiles inmunológicos *in vitro* de las cepas probióticas (figuras 1, 2, 3 y 5) y en los fermentos lácticos (figura 4). El análisis de componentes principales de los datos de CMSP generados con cepas probióticas vivas y tratadas térmicamente ( $140^{\circ}\text{C}$ , 15 segundos) y con fermentos lácticos reveló que las cepas vivas estaban dispersas a lo largo de todo el eje x, lo cual indica que presentan unos perfiles inmunológicos muy diferentes *in vitro*, desde débiles (lado izquierdo) hasta potentes (lado derecho) inductores de citocinas proinflamatorias. Las cepas tratadas térmicamente están agrupadas en el lado izquierdo del gráfico, lo cual indica que inducen mucho menos las citocinas proinflamatorias (figura 6). En cambio las bacterias tratadas térmicamente a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos indujeron más citocinas proinflamatorias y menos IL-10 que las células vivas, lo cual da como resultado mayores relaciones IL-12p40 / IL-10 (figura 7).

Los tratamientos de tipo UHT y HTST potencian o generan perfiles antiinflamatorios.

Las cepas tratadas por UHT y HTST exhiben perfiles antiinflamatorios con independencia de sus respectivos perfiles inmunológicos iniciales (células vivas). Se comprobó que las cepas probióticas conocidas por ser antiinflamatorias *in vivo* y presentar perfiles antiinflamatorios *in vitro* (*B. longum* NCC 3001, *B. longum* NCC 2705, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818) mostraban unos perfiles antiinflamatorios *in vitro* acentuados después de los tratamientos a "temperatura elevada por breve tiempo". Tal como se muestra en la figura 1, las relaciones IL-12p40 / IL-10 de las cepas de *Bifidobacterium* tratadas por UHT fueron inferiores a las de los homólogos vivos, lo cual demuestra que las muestras tratadas por UHT tienen mejores perfiles antiinflamatorios. Lo más sorprendente es que la generación de perfiles antiinflamatorios mediante los tratamientos de tipo UHT y HTST también se confirmó en el caso de cepas

vivas no antiinflamatorias. Tanto el *L. rhamnosus* NCC 4007 como el *L. paracasei* NCC 2461 mostraron elevadas relaciones IL-12p40 / IL-10 *in vitro* (figuras 2 y 5). Se comprobó que las dos cepas vivas no protegían contra la colitis inducida por TNBS en ratones. Las relaciones IL-12p40 / IL-10 inducidas por *L. rhamnosus* NCC 4007 y *L. paracasei* NCC 2461 disminuyeron radicalmente después de los tratamientos a “temperatura elevada por breve tiempo” (UHT o HTST), llegando a niveles tan bajos como los obtenidos con las cepas de *Bifidobacterium*. Estas bajas relaciones de IL-12p40 / IL-10 son debidas a los pequeños niveles de producción de IL-12p40 combinados con ninguna variación (*L. rhamnosus* NCC 4007) o con una radical inducción de la producción de IL-10 (*L. paracasei* NCC 2461) (figura 2).

Por consiguiente:

- Los perfiles antiinflamatorios de los microorganismos vivos se pueden potenciar mediante tratamientos térmicos del tipo UHT y HTST (como por ejemplo *B. longum* NCC 2705, *B. longum* NCC 3001, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818).
- Se pueden generar perfiles antiinflamatorios partiendo de microorganismos vivos no antiinflamatorios (como por ejemplo *L. rhamnosus* NCC 4007, *L. paracasei* NCC 2461, *S. thermophilus* NCC 2019) de fermentos lácticos mediante tratamientos térmicos del tipo UHT y HTST.
- También se comprobaron perfiles antiinflamatorios en el caso de cepas asiladas de productos comercialmente disponibles (figuras 3 A y B), incluyendo una cepa probiótica de *E. coli*.

El impacto de los tratamientos tipo UHT/HTST fue similar para todos los probióticos y fermentos lácticos ensayados como por ejemplo lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos.

Los tratamientos tipo UHT/HTST se aplicaron a varios lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos que mostraban diferentes perfiles inmunológicos *in vitro*. Tras los tratamientos del tipo UHT/HTST todas las cepas indujeron menos citocinas proinflamatorias que sus homólogas vivas (figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6), lo cual demuestra que los efectos de los tratamientos del tipo UHT/HTST en las propiedades inmunológicas de las resultantes bacterias no replicantes se pueden generalizar a todos los probióticos, en particular a lactobacilos y bifidobacterias, a cepas específicas de *E. coli* y a todos los cultivos de fermentos lácticos, sobre todo a estreptococos, lactococos y lactobacilos.

Ejemplo 2:

Metodología

Preparaciones bacterianas:

- Para investigar las propiedades inmunopotenciadoras de los probióticos no replicantes se emplearon cinco cepas probióticas: 3 bifidobacterias (*B. longum* NCC3001, *B. lactis* NCC2818, *B. breve* NCC2950) y 2 lactobacilos (*L. paracasei* NCC2461, *L. rhamnosus* NCC4007).

- Las células bacterianas se cultivaron en medio MRS mediante fermentación por lotes a 37°C durante 16-18 h, sin control de pH. Las células bacterianas se centrifugaron (5.000 x g, 4°C) y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato antes de diluirlas en agua salina para llegar a una concentración final de aproximadamente 10E10 ufc/ml. El *B. longum* NCC3001, el *B. lactis* NCC2818, el *L. paracasei* NCC2461 y el *L. rhamnosus* NCC4007 se trataron a 85°C durante 20 minutos en un baño de agua. El *B. breve* NCC2950 se trató a 90°C durante 30 minutos en un baño de agua. Las suspensiones bacterianas tratadas térmicamente se repartieron en alícuotas y se conservaron congeladas a -80°C hasta su uso. Las bacterias vivas se conservaron a -80°C en PBS con 15% de glicerina hasta su uso.

*Perfilado inmunológico in vitro de las preparaciones bacterianas*

- Se determinaron los perfiles inmunológicos de preparaciones bacterianas vivas y térmicamente tratadas (es decir la capacidad de inducir la secreción *in vitro* de citocinas específicas de células sanguíneas humanas). Las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) humana se aislaron de los filtros sanguíneos. Tras la separación por gradiente de densidad celular, las células mononucleares se recogieron y se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank. Después las células se resuspendieron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (MDMI, de Sigma) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Bioconcept, Paris, Francia), L-glutamina al 1% (Sigma), penicilina/estreptomina al 1% (Sigma) y gentamicina al 0,1% (Sigma). Luego las CMSP (7 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) se incubaron con bacterias vivas y tratadas térmicamente (el equivalente a 7 x 10<sup>6</sup> ufc/pocillo) en placas de 48 pocillos durante 36 h. Los efectos de las bacterias vivas y tratadas térmicamente se ensayaron con CMSP de 8 donantes individuales divididos en dos experimentos separados. Tras 36 h de incubación las placas de cultivo se congelaron y se conservaron a -20°C hasta la medición de las citocinas. El perfilado de citocinas se realizó en paralelo (es decir en el mismo ensayo y con el mismo lote de CMSP) para las bacterias vivas y sus homólogas tratadas térmicamente.

- Los niveles de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-12p40, TNF- $\alpha$  e IL-10) en los sobrenadantes de los cultivos celulares tras 36 h de incubación se determinaron por ELISA (R&D DuoSet Human IL-10, BD OptEIA Human IL12p40, BD OptEIA Human TNF $\alpha$ , BD OptEIA Human IFN- $\gamma$ ) según las instrucciones del fabricante. Las IFN- $\gamma$ , IL-12p40 y TNF- $\alpha$  son citocinas proinflamatorias, mientras que la IL-10 es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados están expresados

como medias (pg/ml)  $\pm$  ESM de 4 donantes individuales y son representativos de dos ensayos separados realizados respectivamente con 4 donantes.

*Efecto in vivo del Bifidobacterium breve NCC2950 vivo y tratado térmicamente en la prevención de la diarrea alérgica*

Para probar el efecto promotor de Th1 del *B. breve* NCC2950 se usó un modelo murino de diarrea alérgica (Brandt E.B y otros. JCI 2003; 112(11): 1666-1667). Tras la sensibilización (2 inyecciones intraperitoneales de ovoalbúmina (OVA) y sulfato aluminico-potásico en un intervalo de 14 días; días 0 y 14) los ratones Balb/c macho recibieron OVA por vía oral 6 veces (días 27, 29, 32, 34, 36, 39) y como resultado tuvieron síntomas clínicos temporales (diarrea) y variaciones de los parámetros inmunitarios (concentración en plasma de IgE total, IgE específica de OVA, proteasa 1 de mastocitos murinos, es decir MMCP-1). Se administró por sonda gástrica *Bifidobacterium breve* NCC2950, vivo o tratado térmicamente a 90°C durante 30 minutos, 4 días antes de la sensibilización con OVA (días -3, -2, -1, 0 y días 11, 12, 13 y 14) y durante el periodo de exposición a OVA (días 23 hasta 39). Se usó una dosis bacteriana diaria de aproximadamente 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (ufc) o de ufc equivalentes/ratón.

Resultados

Inducción de la secreción de citocinas “proinflamatorias” tras el tratamiento térmico

Se determinó *in vitro* la capacidad de las cepas bacterianas tratadas térmicamente para estimular la secreción de citocinas por células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) humana. Los perfiles inmunológicos basados en cuatro citocinas al estimular las CMSP con las bacterias tratadas térmicamente se compararon con los inducidos por células bacterianas vivas en el mismo ensayo *in vitro*.

Las preparaciones tratadas térmicamente se cultivaron en placas y se evaluaron para determinar la ausencia de cualquier recuento viable. Las preparaciones bacterianas térmicamente tratadas no produjeron colonias después de cultivarlas en placas.

Los probióticos vivos indujeron niveles de producción de citocinas diferentes y dependientes de la cepa al incubarlos con CMSP humanas (figura 8). El tratamiento térmico de los probióticos modificó los niveles de citocinas producidos por las CMSP, comparadas con sus homólogas vivas. Las bacterias tratadas térmicamente indujeron más citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p40) que sus homólogas vivas. En cambio las bacterias tratadas térmicamente indujeron unas cantidades similares o menores de IL-10 en comparación con las células vivas (figura 8). Estos datos demuestran que las bacterias tratadas térmicamente tienen mayor capacidad de estimular el sistema inmunitario que sus homólogas vivas y por tanto también son más capaces de potenciar defensas inmunitarias debilitadas. En otras palabras, los datos *in vitro* indican un efecto inmunopotenciador intensificado tras el tratamiento térmico.

Para ilustrar el mayor efecto del *B. breve* NCC2950 tratado térmicamente (comparado con las células vivas) en el sistema inmunitario, tanto el *B. breve* NCC2950 vivo como el tratado térmicamente (cepa A) se ensayaron en un modelo animal de diarrea alérgica.

Comparada con el grupo de control positivo, la intensidad de la diarrea disminuyó significativa y consistentemente tras el tratamiento con el *B. breve* NCC2950 tratado térmicamente (41,1%  $\pm$  4,8), mientras que la intensidad de la diarrea se redujo solo un 20  $\pm$  28,3% tras el tratamiento con el *B. breve* NCC2950 vivo. Estos resultados demuestran que el *B. breve* NCC2950 tratado térmicamente muestra un mayor efecto protector contra la diarrea alérgica que su homólogo vivo (figura 9).

Por consiguiente se demostró que la capacidad de los probióticos para potenciar las defensas inmunitarias mejora tras el tratamiento térmico.

Otros ejemplos:

Se prepararon las siguientes composiciones de leche de crecimiento:

	> 10 meses
Proteína (g/100 kcal)	2,23
Suero de leche/caseína	50/50
CHO (g/100 kcal)	13,0
Lactosa (g/100 kcal)	7,7
Maltodextrina (g/100 kcal)	4,0
Almidón (g/100 kcal)	1,0
Sacarosa (g/100 kcal)	
Grasa (g/100 kcal)	4,31
Prebióticos (g/100 kcal)	-
Energía Kcal/100 ml	70

## ES 2 572 760 T3

La composición de la leche de crecimiento contiene  $10^9$  ufc de *Lactobacillus johnsonii* La1 / g de peso seco.

	> 1 año					
Proteína (g/100 kcal)	2,7	2,22	2,23	2,3	2,9	2,26
Suero de leche/caseína	23/77	40/60	40/60	40/60	77/23	60/40
CHO (g/100 kcal)	12,2	13,5	13,1	13,0	11,9	13,9
Lactosa (g/100 kcal)	5,05	6,7	6,1	4,9	4,42	5,33
Maltodextrina (g/100 kcal)	4,99	5,8	5,5	4,9	2,31	2,35
Almidón (g/100 kcal)	-	1,0	1,0	2,9	2,29	3,17
Sacarosa (g/100 kcal)	1,93				2,66	2,41
Grasa (g/100 kcal)	4,5	4,14	4,31	4,3	4,53	3,93
Prebióticos (g/100 kcal)	-	0,58	0,58	0,52	-	0,49
Energía Kcal/100 ml	70	70	70	79	80	

5 Las composiciones de la leche de crecimiento contienen  $10^9$  ufc de *Bifidobacterium longum* NCC 3001 tratado térmicamente (75°C, 20min) / g de peso seco.

	> 2 años	
Proteína (g/100 kcal)	2,5	2,5
Suero de leche/caseína	50/50	40/60
CHO (g/100 kcal)	14,6	14,6
Lactosa (g/100 kcal)	8,7	6,9
Maltodextrina (g/100 kcal)	4,6	6,6
Almidón (g/100 kcal)	1,0	1,0
Sacarosa (g/100 kcal)		
Grasa (g/100 kcal)	3,5	3,5
Prebióticos (g/100 kcal)	-	0,58
Energía Kcal/100 ml	70	70

10 Las composiciones de la leche de crecimiento contienen  $10^9$  ufc de *Lactobacillus johnsonii* La1 tratado por UHT / g de peso seco.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición de leche de crecimiento que lleva microorganismos probióticos, para ser administrada a niños pequeños a partir de 10 meses de edad, en la cual los microorganismos probióticos son del tipo no replicante y al menos el 90% de dichos microorganismos probióticos son microorganismos probióticos no replicantes, en la cual dichos microorganismos probióticos no replicantes son de *Bifidobacterium breve* NCC 2950, de manera que dicha composición tiene una densidad calórica comprendida en el intervalo de 70-80 kcal/100ml y contiene una fuente proteica en una proporción de 2-3 g/100 kcal, una fuente de hidratos de carbono en una proporción de 12-15 g/100 kcal y una fuente de lípidos en una proporción de 3-4,6 g/100kcal.
2. Composición según la reivindicación 1, que contiene 0,15-0,25 g de AGPI-CL/100g de ácidos grasos, en la cual los AGPI-CL se puede elegir entre ARA, DHA y combinaciones de los mismos.
3. Composición según la reivindicación 1 o 2, que contiene 1,5-2,5 mg de nucleótidos por 100 ml de fórmula.
4. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, que contiene microorganismos probióticos en una cantidad correspondiente a  $10^6$  hasta  $10^{12}$  ufc aproximadamente.
5. Composición según una de las reivindicaciones 3 o 4, en que los microorganismos probióticos no replicantes han sido transformados en no replicantes mediante un tratamiento térmico, preferiblemente mediante un tratamiento de alta temperatura a por lo menos 71,5°C durante al menos 1 segundo.
6. Composición según la reivindicación 5, en que el tratamiento térmico es un tratamiento de alta temperatura a 71,5-150°C durante 1-120 segundos aproximadamente y preferiblemente es un tratamiento a temperatura elevada por breve tiempo (HTST) o un tratamiento a temperatura ultra-elevada (UHT).
7. Composición según la reivindicación 6 para usar en la prevención o el tratamiento de trastornos inflamatorios.
8. Composición según la reivindicación 5, cuyo tratamiento térmico se efectúa en un intervalo de temperatura de 70-150°C aproximadamente durante unos 3 minutos – 2 horas, preferiblemente en el intervalo de 80-140°C durante 5 minutos – 40 minutos.
9. Composición según la reivindicación 8 para usar en la prevención o el tratamiento de trastornos relacionados con una defensa inmunológica comprometida.
10. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, en la cual al menos el 95%, con mayor preferencia al menos el 98%, sobre todo al menos el 99%, idealmente al menos el 99,9 % y en el caso más ideal todos los probióticos son no replicantes.
11. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, que contiene 0,005 mg - 1000 mg de microorganismos no replicantes por dosis diaria.

Figura 1A

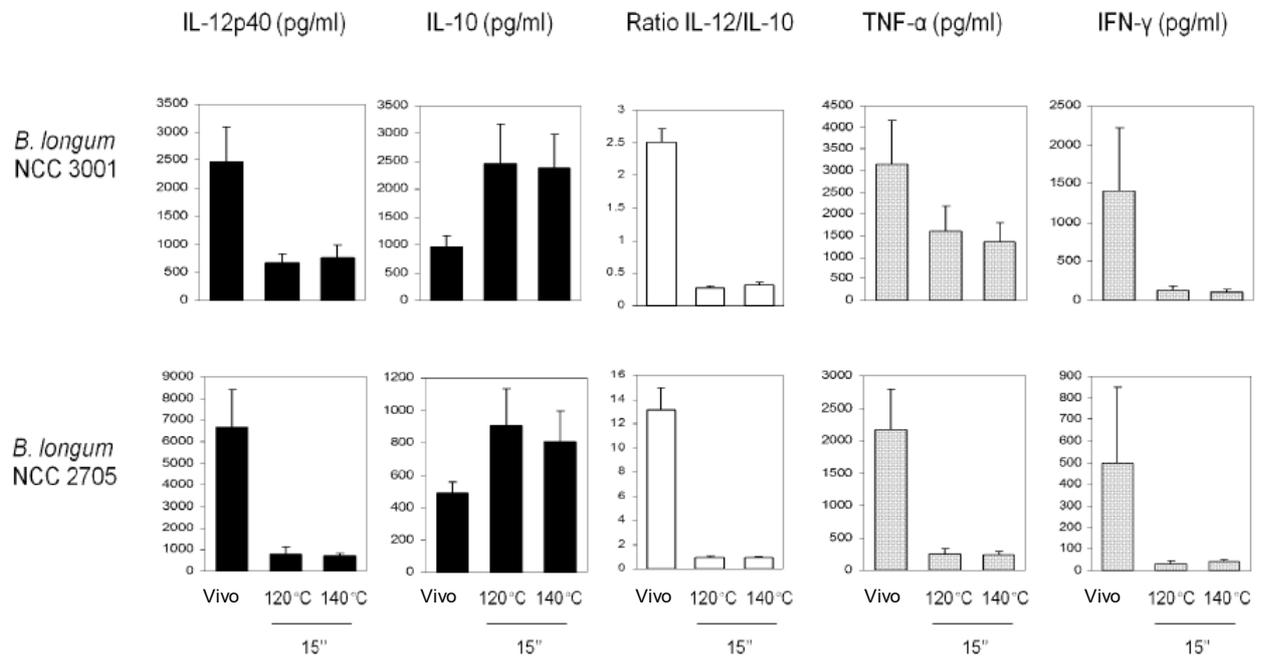


Figura 1B

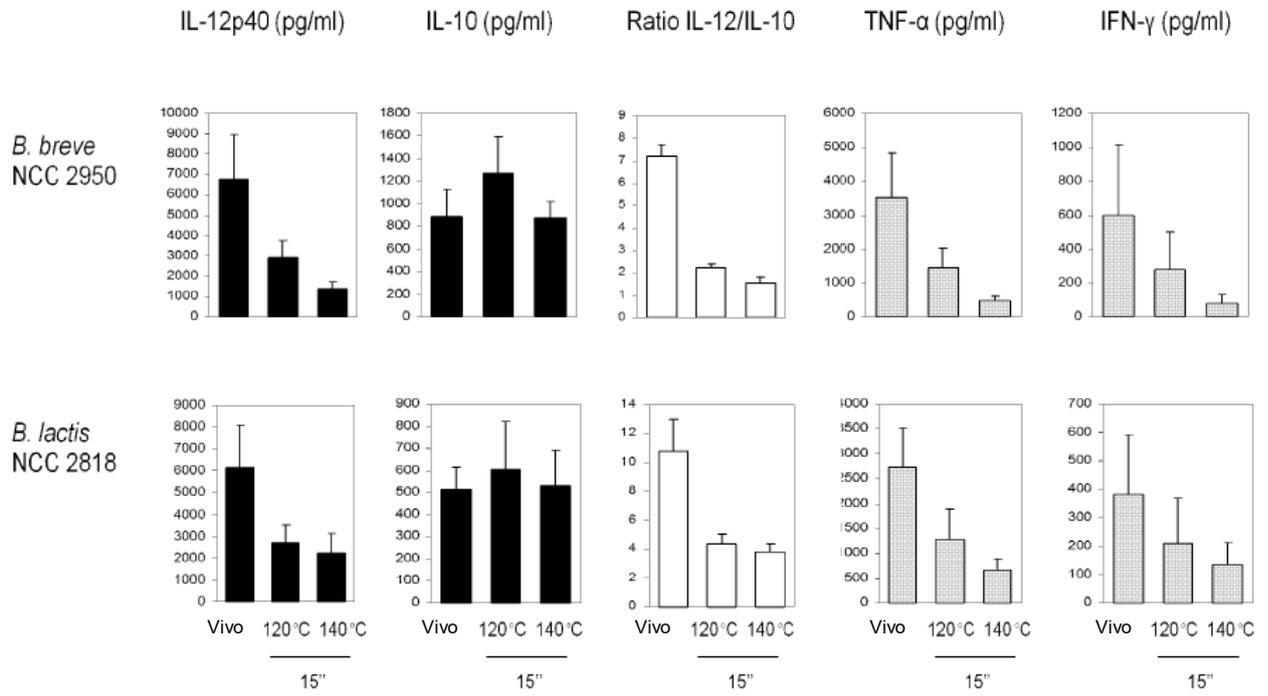


Figura 2

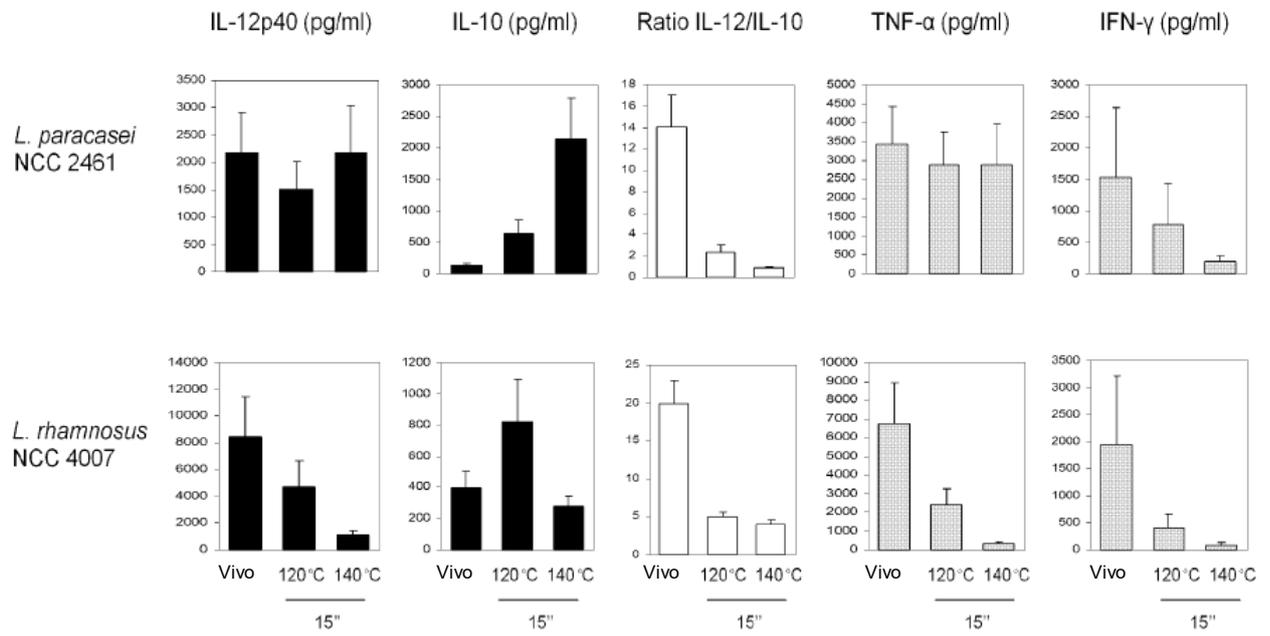


Figura 3A

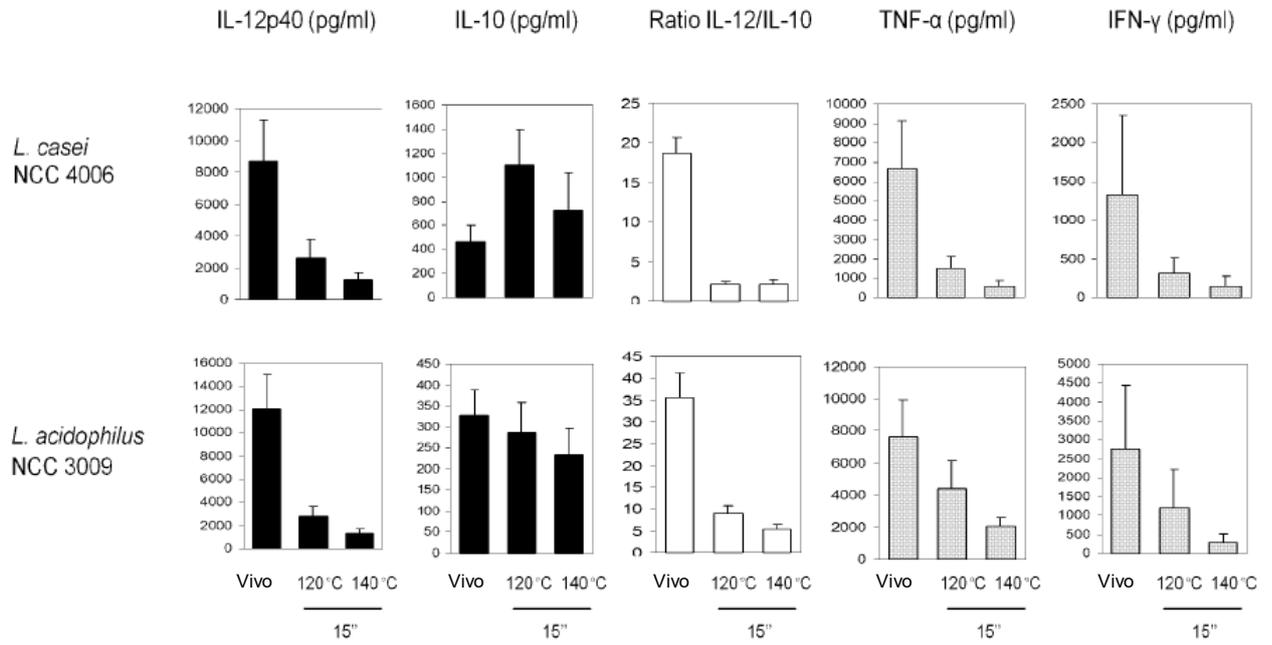


Figura 3B

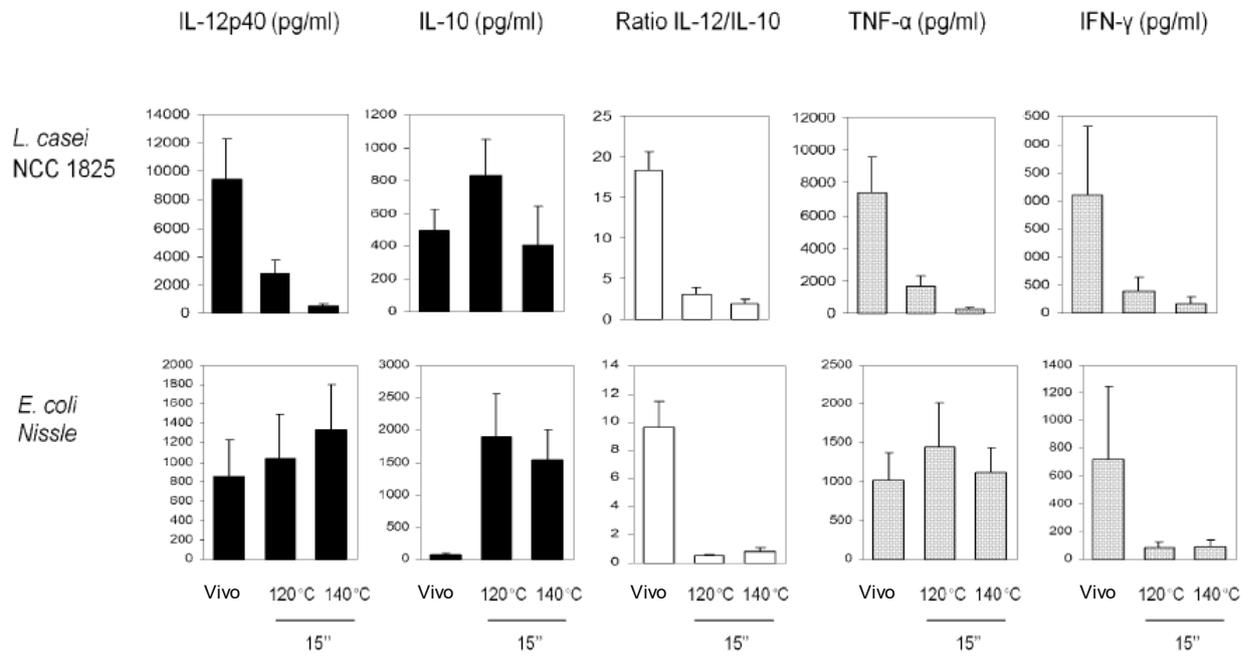


Figura 4A

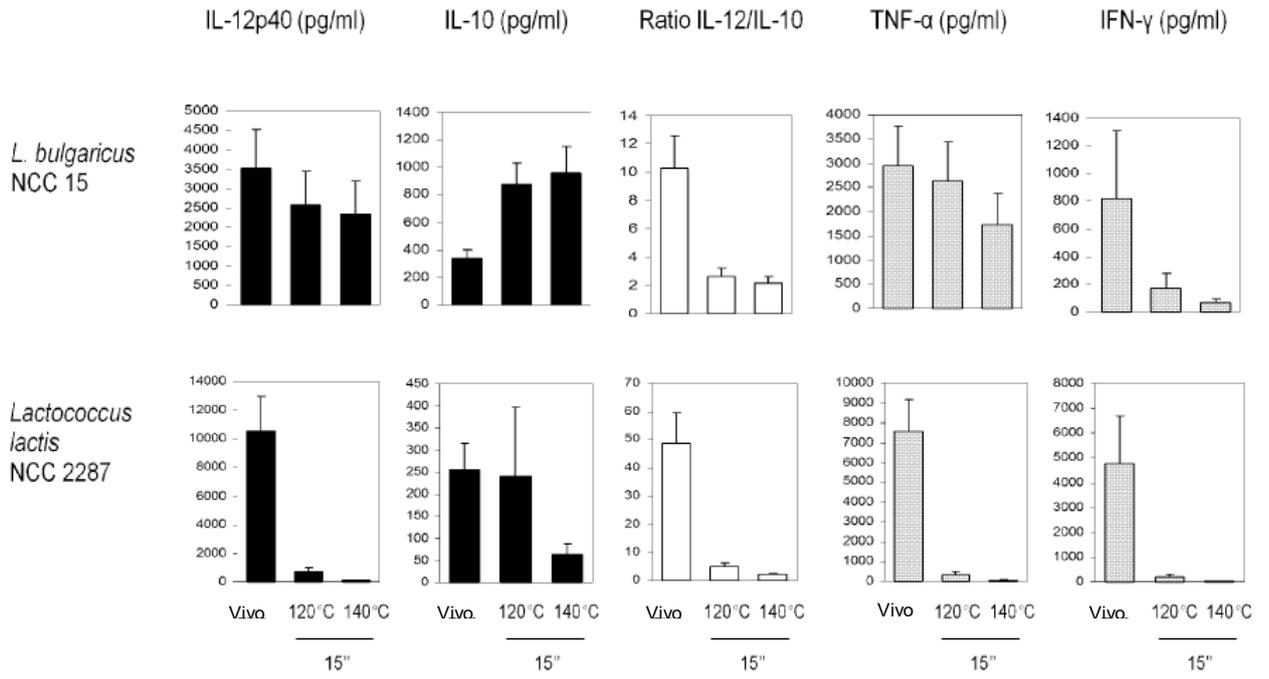


Figura 4B

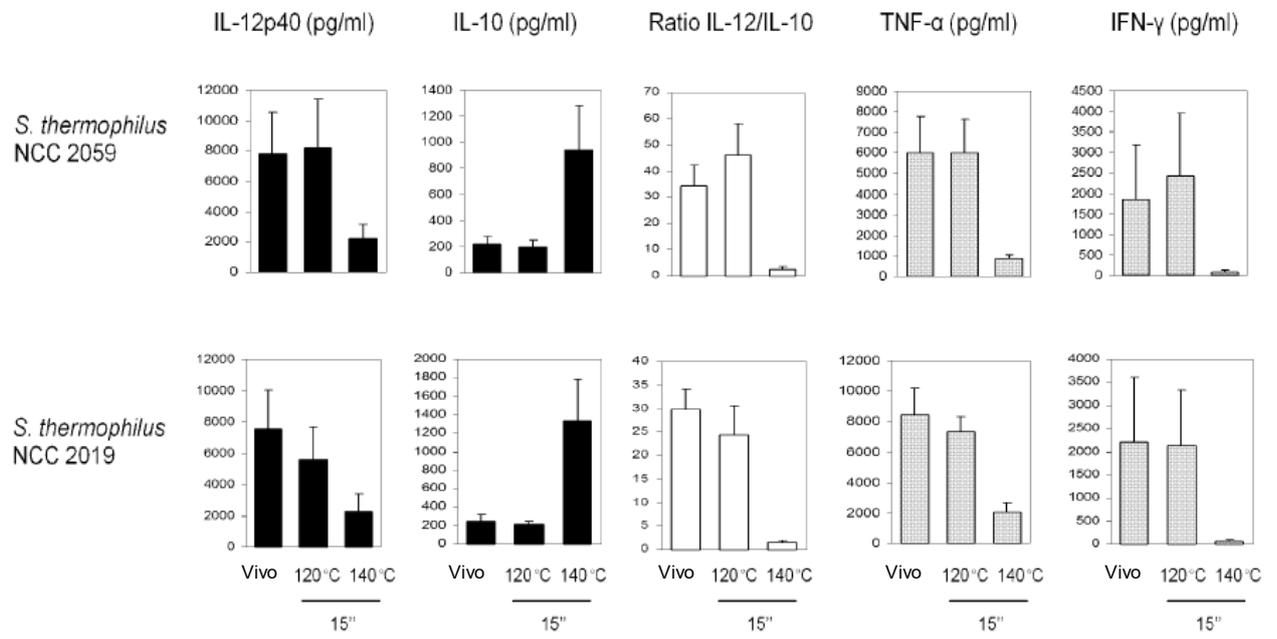


Figura 5

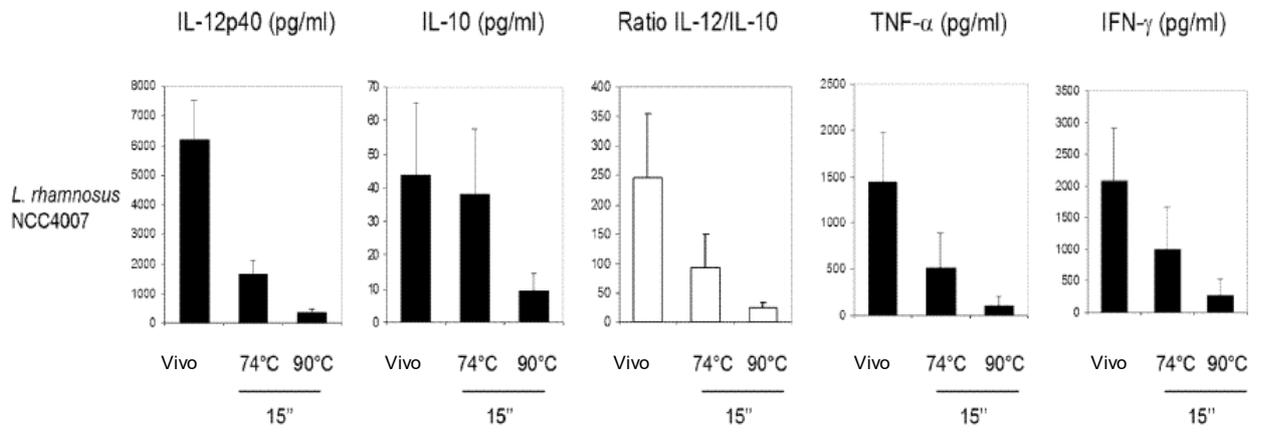


Figura 6

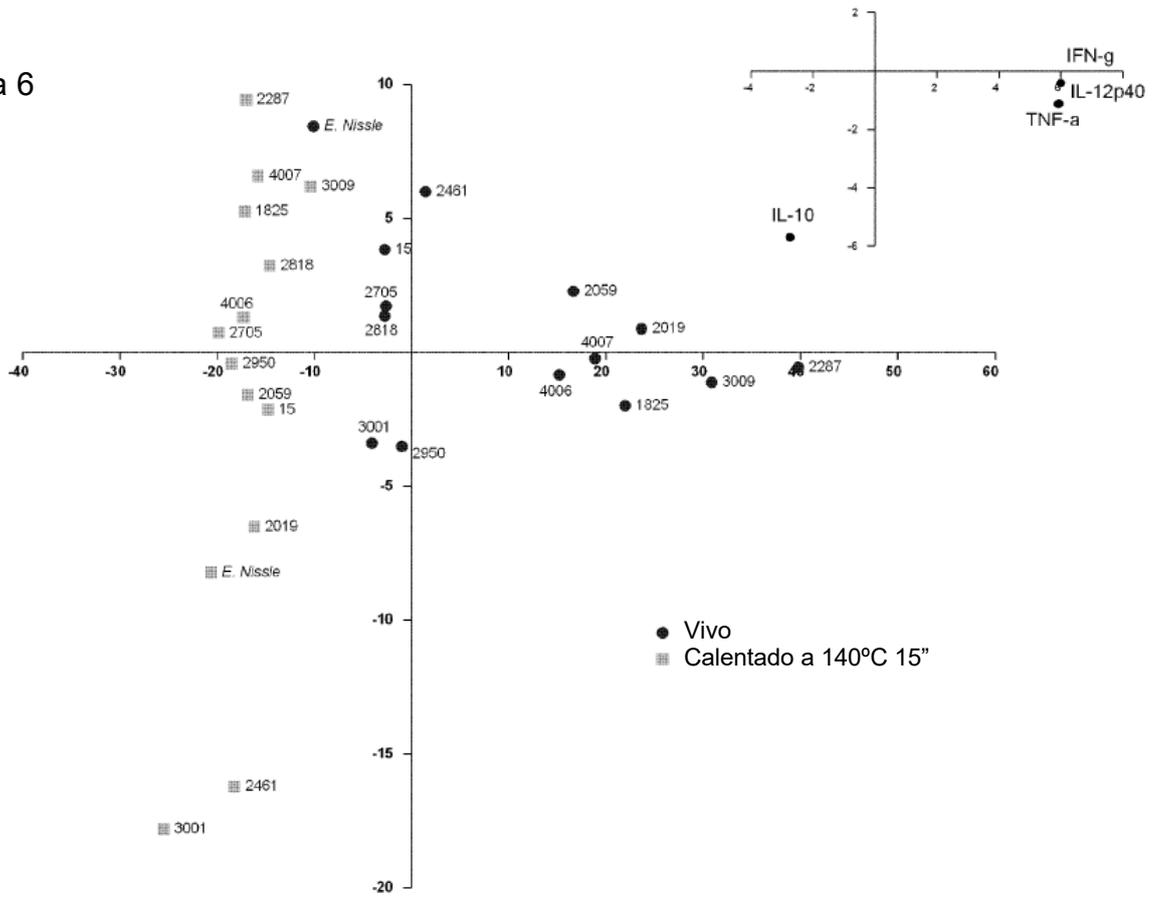


Figura 7

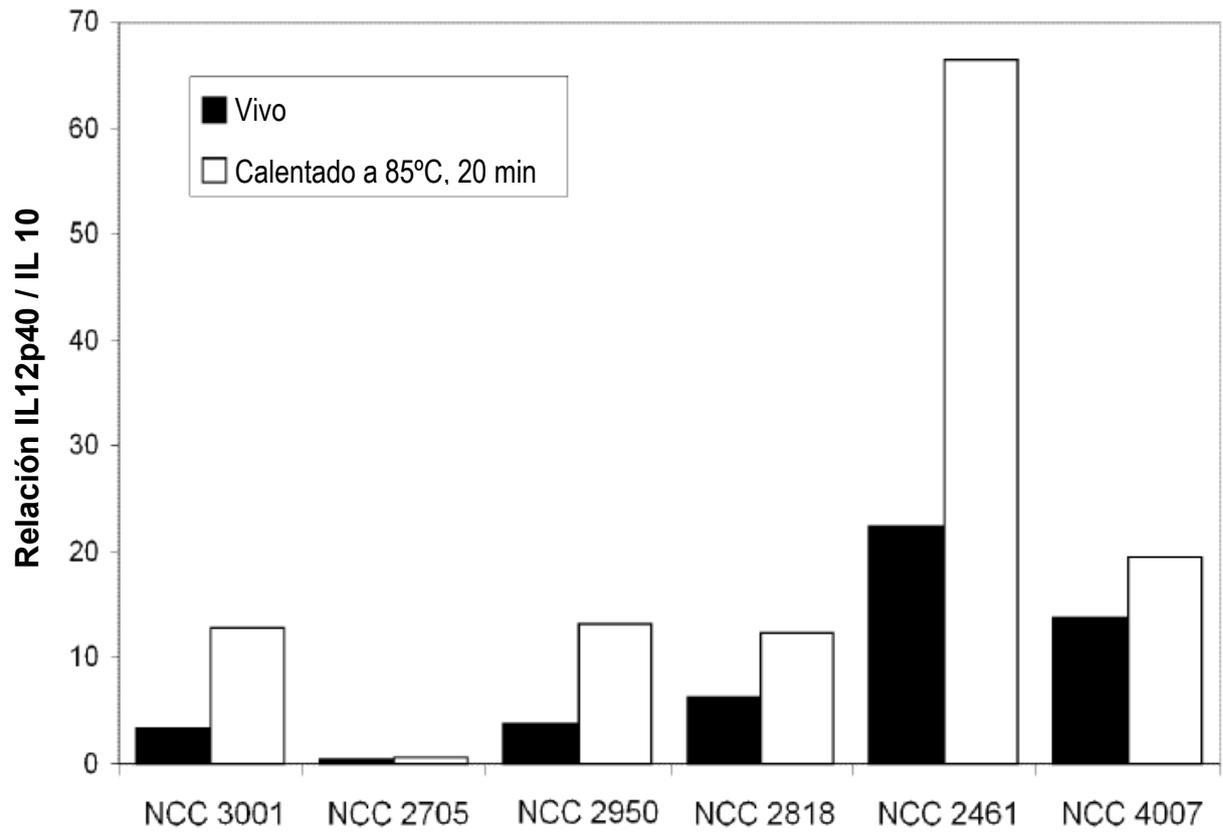


Figura 8:

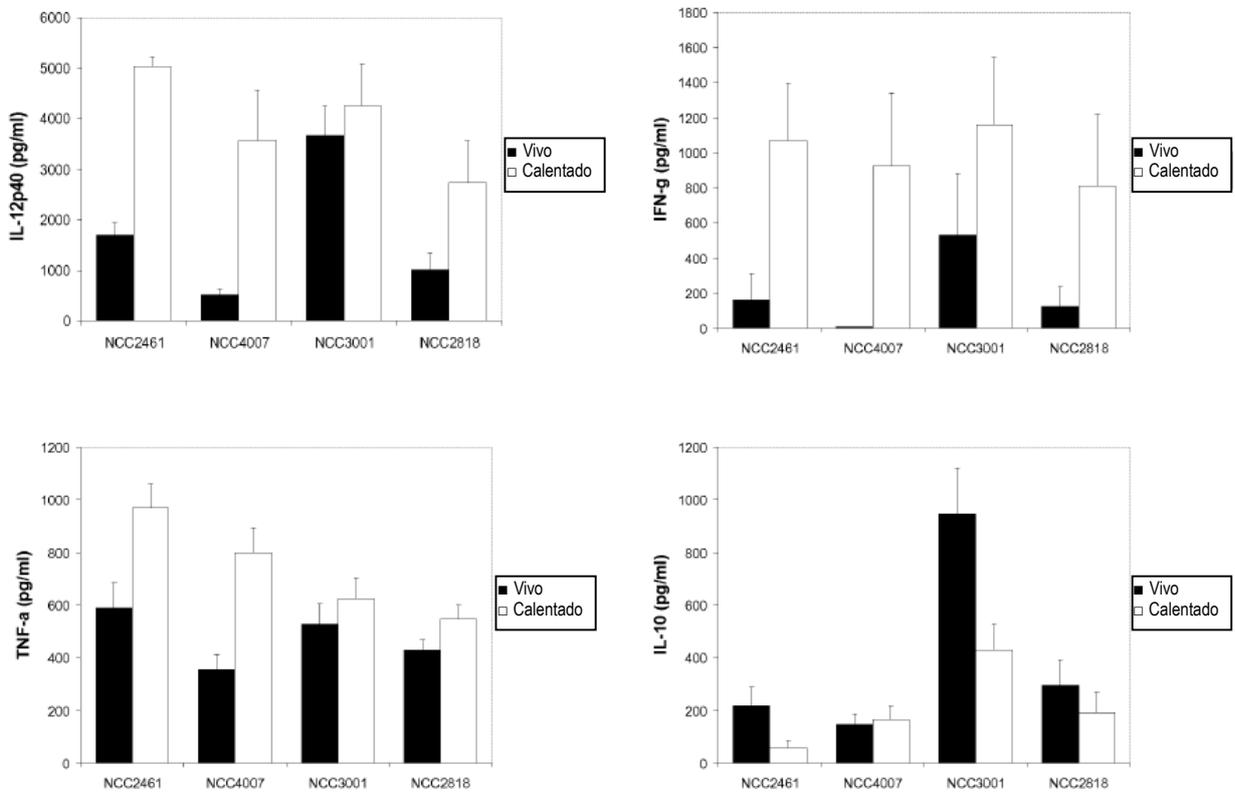


Figura 9:

