

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 831**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 35/74 (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 10747838 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2429557**

54 Título: **Fórmulas de alimentación infantil que comprenden 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:

11.07.2016

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

ES 2 576 831 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

Fórmulas de alimentación infantil que comprenden microorganismos probióticos

- 5 La presente invención se relaciona con el campo de la nutrición del lactante. En particular, La presente invención se relaciona con fórmulas de alimentación infantil que comprenden microorganismos probióticos. Estos microorganismos probióticos pueden ser microorganismos probióticos no replicantes, tales como microorganismos probióticos bioactivos tratados con calor, por ejemplo.
- 10 La leche materna es el alimento ideal para un crecimiento y desarrollo sanos de los bebés. En 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) cambió su duración recomendada de la lactancia materna exclusiva de 4 a 6 meses a 6 meses, por tanto, la lactancia materna exclusiva debería alentarse y promoverse de acuerdo con esto.
- 15 Sin embargo, no todas las madres son capaces de alimentar a sus bebés sólo con leche materna durante 6 meses, o, por diversas razones, eligen no hacerlo.
- La cifra global de lactancia materna exclusiva fue de 46 % en 1999, de acuerdo con UNICEF. Sin embargo, esta situación varía drásticamente de un país a otro país. Por ejemplo, la cifra publicada de lactancia materna exclusiva en Liberia es del 73 %, mientras que en Kenia alcanza sólo el 5 %.
- 20 Muchos factores podrían tener un impacto sobre los patrones de lactancia materna exclusiva y suelen estar ligados a circunstancias económicas, sociales y culturales.
- 25 Asimismo, una parte significativa de todas las madres es incapaz de proporcionar cantidades suficientes de leche a sus bebés, por lo que se necesita nutrición complementaria.
- La fórmula infantil es la mejor alternativa nutricional para los bebés que no se alimentan con leche materna o no se alimentan con leche materna suficientemente.
- 30 La Ley Federal de Medicamentos, Alimentos y Cosméticos (FFDCA, por sus siglas en inglés) define la fórmula infantil como "un alimento que pretende ser o representar el uso alimenticio especial únicamente como un alimento para lactantes por razón de su simulación de la leche humana o su adecuación como un sustituto completo o parcial para la leche humana" (FFDCA 201(z)).
- 35 Una importante función de la nutrición precoz de los lactantes es generar una flora intestinal sana y desarrollar un sistema inmunitario fuerte.
- Una flora intestinal sana contribuirá a un tracto GI funcional, el cual, a su vez, ayudará a digerir adecuadamente el alimento ingerido y reducirá el dolor estomacal en los recién nacidos.
- 40 Sería deseable, por tanto, mejorar más el efecto de refuerzo inmunitario de las fórmulas infantiles, para mejorar más su efecto antiinflamatorio y facilitar la digestión.
- Por tanto, existe una necesidad en la técnica de una fórmula de alimentación infantil que permita proporcionar a los lactantes una nutrición que esté lo más cerca posible de la leche materna. Dicha fórmula de alimentación infantil debería tener un efecto de refuerzo inmunitario mejorado, un efecto antiinflamatorio y/o debería facilitar la digestión. Se preferiría si esto se lograra mediante el uso de ingredientes naturales que sean seguros para su administración sin efectos secundarios y que sean fáciles de incorporar a las fórmulas de alimentación infantil usando técnicas industriales del estado de la técnica.
- 45 Los presentes inventores han abordado esta necesidad. Ha sido, por tanto, el objetivo de la presente invención mejorar el estado de la técnica y proporcionar una fórmula de alimentación infantil que satisfaga las necesidades expresadas anteriormente.
- 50 Los presentes inventores se sorprendieron de ver que podían lograr este objetivo mediante la materia objeto de la reivindicación independiente. Las reivindicaciones dependientes desarrollan más la idea de la presente invención. Por consiguiente, los presentes inventores proponen proporcionar una fórmula de alimentación infantil que comprende microorganismos probióticos no replicantes que se han hecho no replicantes mediante un tratamiento térmico que es un tratamiento a alta temperatura a 71,5-150 °C durante 1-120 segundos, para administrar a los lactantes.
- 60 El reglamento de la FDA define a los lactantes como personas de no más de 12 meses de edad (Título 21, del Código de Reglamentos Federales, 21 CFR 105.3 (e)). Se encontró que los probióticos eran capaces de proporcionar sus beneficios para la salud en el marco de las fórmulas de alimentación infantil. Además, p. ej., las bifidobacterias, están presentes en la leche materna y son parte de lo que da a la leche materna sus propiedades protectoras naturales. Por tanto, la adición de microorganismos probióticos a las fórmulas de alimentación infantil les permitiría asemejarse más a la leche materna.
- 65

Sin embargo, como, en particular, las fórmulas de alimentación infantil en polvo para reconstituir con agua suelen tener un periodo de caducidad que excede el periodo de caducidad de, p. ej., las bebidas de yogur que comprenden probióticos, los probióticos no se suelen añadir a dichas fórmulas de alimentación infantil, debido a la incertidumbre de que pueda garantizarse la viabilidad de los probióticos durante un periodo de caducidad prolongado. Los presentes inventores fueron capaces ahora de mostrar que incluso los probióticos no replicantes pueden proporcionar los beneficios para la salud de los probióticos e incluso pueden tener beneficios mejorados.

Por tanto, una realización de la presente invención es una fórmula de alimentación infantil para administrar a un lactante como única fuente de nutrición o como única fuente de nutrición complementaria además de la lactancia materna, que proporciona una nutrición completa al lactante y comprende microorganismos probióticos no replicantes en la que los microorganismos probióticos no replicantes se hicieron no replicantes mediante un tratamiento térmico que es un tratamiento a alta temperatura a 71,5-150 °C durante 1-120 segundos.

Una composición proporciona nutrición completa si un lactante obtiene todos los nutrientes necesarios a partir de esta composición y no se necesita ninguna fuente de alimentación adicional.

La fórmula de alimentación infantil puede proporcionarse como composición líquida lista para administrarse o como composición deshidratada para reconstituirse con agua antes de su uso.

Si se proporciona como composición deshidratada, se prefiere que la composición tenga una actividad acuosa por debajo de 0,2, preferentemente por debajo de 0,15 para aumentar más la estabilidad en almacenamiento. La mayoría de las bacterias, por ejemplo, no crecen a actividades acuosas por debajo de 0,91, y la mayoría de los mohos dejan de crecer a actividades acuosas por debajo de 0,80.

La actividad acuosa (a_w) es una medida del estado energético del agua en un sistema. Se define como la presión de vapor de agua del agua dividido por el del agua pura. Por consiguiente, el agua destilada tiene una presión de agua de 1. La fórmula de alimentación infantil de acuerdo con la presente invención pueden tener una densidad calórica en el intervalo de 62-68 kcal/100 ml.

Típicamente, una fórmula de alimentación infantil puede comprender una fuente de proteína en una cantidad de 1,5-2,8 g/100kcal, una fuente de carbohidratos en una cantidad de 10-12 g/100kcal, y una fuente de lípidos en una cantidad de 5-5,5 g/100kcal.

La fuente de proteína puede consistir en proteínas de suero de leche y caseína. Puede usarse, por ejemplo, una proporción de suero de leche a caseína en el intervalo de alrededor de 70:30. Sin embargo, para necesidades de proteína mayores, el suero de leche y la caseína pueden usarse en una proporción en el intervalo de 20:80 a 50:50.

La fuente de carbohidratos puede consistir esencialmente en lactosa. Sin embargo, también pueden usarse proporciones de lactosa y maltodextrina en el intervalo de 3:1 a 1:1, por ejemplo.

La fórmula de alimentación infantil de la presente invención puede comprender 0,2-0,3 g de AGPICL/100g de ácidos grasos. Los AGPICL pueden comprender, por ejemplo, una combinación de AA y ADH. Se ha demostrado que las fórmulas que contienen ADH y AA proporcionan un desarrollo visual y mental similar al del infante alimentado con leche materna.

La fórmula de alimentación infantil 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 el organismo del lactante puede sintetizarlos a partir de compuestos más sencillos. En ciertas ocasiones, sin embargo, los procesos de síntesis pueden no ser capaces de cumplir con la demanda, por ejemplo, durante periodos de rápida renovación celular, como en el crecimiento normal o en la enfermedad intestinal. En estas ocasiones, el organismo depende más fuertemente de las fuentes alimenticias de nucleótidos.

La fórmula de alimentación infantil puede comprender en parte o únicamente microorganismos probióticos no replicantes.

Los inventores se sorprendieron de ver, p. ej., que en cuanto a un efecto inmunitario y/o en cuanto a un efecto inflamatorio, los microorganismos no replicantes pueden ser incluso más eficaces que los microorganismos probióticos replicantes.

Esto es sorprendente, ya que los probióticos suelen definirse como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud al anfitrión (directrices de FAO/OMS). La inmensa mayoría de la bibliografía publicada trata de probióticos vivos. Además, algunos estudios investigaron los beneficios para la salud proporcionados por bacterias no replicantes y la mayoría de ellos indicaron que la inactivación de los probióticos, p. ej., mediante tratamiento térmico, conducía a una pérdida de su beneficio pretendido para la salud (Rachmilewitz, D., et al., 2004, Gastroenterology 126:520-528; Castagliuolo, et al., 2005, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43:197-204; Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, Br. J. Nutr. 86:285-289; Kaila, M., et al., 1995, Arch.Dis.Child 72:51-53.). Algunos estudios demostraron que los probióticos muertos pueden conservar algunos beneficios para la salud (Rachmilewitz, D., et al., 2004, Gastroenterology 126:520-528; Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, Br. J. Nutr. 86:285-289), pero claramente, los probióticos vivos se consideraron en la técnica hasta ahora como de más rendimiento.

La fórmula de alimentación infantil de acuerdo con la presente invención puede comprender microorganismos

probióticos en cualquier cantidad eficaz, por ejemplo, en una cantidad correspondiente a alrededor de 10^6 a 10^{12} ufc/g de peso seco.

Los microorganismos probióticos son microorganismos probióticos no replicantes.

Los microorganismos probióticos "no replicantes" incluyen bacterias probióticas que han sido tratadas con calor. Esto incluye microorganismos que están inactivados, muertos, no viables y/o presentes como fragmentos tales como ADN, metabolitos, compuestos citoplásmicos, y/o materiales de la pared celular.

"No replicantes" significa que no pueden detectarse células viables ni/o unidades formadoras de colonias mediante los métodos clásicos de siembra en placa.

Dichos métodos clásicos de siembra en placa se resumen en el libro de Microbiología: James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden. 2005. Modern food microbiology. 7ª edición, Springer Science, New York, N.Y. pág. 790. Típicamente, la ausencia de células viables puede demostrarse de la forma siguiente: ninguna colonia visible en las placas de agar o ningún incremento de la turbidez en el medio de cultivo líquido después de la inoculación con diferentes concentraciones de preparaciones bacterianas (muestras "no replicantes") e incubación en condiciones apropiadas (atmósfera aerobia y/o anaerobia durante al menos 24 horas).

Los probióticos se definen para los fines de la presente invención como "Preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso para la salud o el bienestar del anfitrión (Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. et al "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999:10 107-10).

La posibilidad de usar microorganismos probióticos no replicantes ofrece varias ventajas. En los lactantes gravemente inmunodeprimidos, el uso de probióticos vivos puede estar limitado en casos excepcionales debido a un riesgo potencial de desarrollar bacteriemia. Los probióticos no replicantes pueden usarse sin ningún problema.

Además, el suministro de microorganismos probióticos no replicantes permite la reconstitución en caliente al tiempo que se conserva el beneficio para la salud.

Las fórmulas de alimentación infantil de la presente invención comprenden microorganismos probióticos y/o microorganismos probióticos no replicantes en una cantidad suficiente para producir, al menos parcialmente, un beneficio para la salud. Una cantidad adecuada para cumplir esto se define como "una dosis terapéuticamente eficaz". La cantidad eficaz para este fin dependerá de una serie de factores conocidos por los expertos en la materia de modo, tales como el peso y el estado general de salud del lactante, y del efecto sobre la matriz alimentaria.

En aplicaciones profilácticas, las fórmulas de alimentación infantil de acuerdo con la invención se administran a un consumidor predispuesto o con algún otro riesgo de un trastorno en una cantidad que es suficiente para reducir, al menos parcialmente el riesgo de desarrollar dicho trastorno. Se define que dicha cantidad es "una dosis profiláctica eficaz". De nuevo, las cantidades precisas dependen de una serie de factores tales como el estado de salud general el peso del lactante, y del efecto sobre la matriz alimentaria. Los expertos en la técnica serán capaces de ajustar la dosis terapéuticamente eficaz y/o la dosis profiláctica eficaz de forma apropiada. En general, la fórmula de alimentación infantil de la presente invención contiene microorganismos probióticos no replicantes en una dosis terapéuticamente eficaz o en una dosis profiláctica eficaz.

Típicamente, la dosis terapéuticamente eficaz y/o la dosis profiláctica eficaz está en el intervalo de alrededor de 0,005 mg-1000 mg de microorganismos probióticos y/o microorganismos probióticos no replicantes por dosis diaria. En cuanto a cantidades numéricas, los microorganismos no replicantes tratados con "alta temperatura a tiempo corto" pueden estar presentes en la fórmula de alimentación infantil en una cantidad correspondiente a entre 10^4 y 10^{12} equivalentes de ufc/g de la composición deshidratada. Obviamente, los microorganismos no replicantes no forman colonias, por consiguiente, esta expresión debe entenderse como la cantidad de microorganismos no replicantes que se obtiene a partir de 10^4 y 10^{12} ufc/g de bacterias replicantes. Esto incluye microorganismos que están inactivados, no viables o muertos, o presentes como fragmentos, tales como ADN o compuestos citoplásmicos o de la pared celular. En otras palabras, la cantidad de microorganismos que contiene la fórmula de alimentación infantil se expresa en cuanto a la capacidad de formar colonias (ufc) de esa cantidad de microorganismos si todos los microorganismos estuvieran vivos, independientemente de si lo están, de hecho, no replicantes, tales como inactivados o muertos, fragmentados o una mezcla de uno o todos estos estados.

Preferentemente, los microorganismos no replicantes están presentes en una cantidad equivalente a entre 10^4 y 10^9 ufc/g de fórmula de alimentación infantil deshidratada, aún más preferentemente, en una cantidad equivalente a entre 10^5 y 10^9 ufc/g de fórmula de alimentación infantil deshidratada.

Las tecnologías disponibles hoy para hacer a las cepas probióticas no replicantes son, normalmente, tratamiento térmico, irradiación y, luz UV o el uso de agentes químicos (formalina, paraformaldehído).

Se preferiría usar una técnica para hacer a los probióticos no replicantes que sea relativamente fácil de aplicar en circunstancias industriales en la industria alimentaria.

La mayoría de los productos actuales del mercado que contienen probióticos se tratan con calor durante su producción. Sería conveniente, por tanto, ser capaz de tratar con calor a los probióticos, bien junto con el producto producido, o bien de una forma similar, al tiempo que los probióticos conservan o mejoran sus propiedades beneficiosas, o incluso ganan una propiedad beneficiosa nueva para el consumidor.

Sin embargo, la inactivación de los microorganismos probióticos mediante tratamientos térmicos se asocia generalmente en la bibliografía con una pérdida al menos parcial de la actividad probiótica.

Los presentes inventores han encontrado ahora, sorprendentemente, que hacer a los microorganismos probióticos no replicantes, p. ej., mediante tratamiento térmico, no resulta en la pérdida de los beneficios probióticos para la salud, sino que -al contrario- puede potenciar los beneficios para la salud existentes e incluso generar beneficios para la salud nuevos.

Por tanto, una realización de la presente invención es una fórmula de alimentación infantil en la que los microorganismos probióticos no replicantes se hicieron no replicantes mediante un tratamiento a 71,5-150 °C durante 1-120 segundos.

A escala industrial, actualmente suelen preferirse los tratamientos térmicos de periodo corto, tales como los tratamientos térmicos de tipo UHT. Este tipo de tratamiento térmico reduce las cargas bacterianas, y reduce el tiempo de procesamiento, reduciendo así la alteración de los nutrientes.

Los inventores demuestran por primera vez que los microorganismos probióticos, tratados con calor a altas temperaturas durante tiempos cortos presentan perfiles inmunitarios antiinflamatorios independientemente de sus propiedades iniciales. En particular, mediante este tratamiento térmico, o bien se desarrolla un nuevo perfil antiinflamatorio, o bien se potencia un perfil antiinflamatorio existente. Por tanto, ahora es posible generar microorganismos probióticos no replicantes con perfiles inmunitarios antiinflamatorios usando parámetros de tratamiento térmico específicos que corresponden a tratamientos térmicos típicamente aplicables a la industria, aun cuando sus homólogos vivos no sean cepas antiinflamatorias.

Por tanto, el tratamiento térmico es un tratamiento a alta temperatura a 71,5-150 °C durante 1-120 segundos. El tratamiento a alta temperatura puede ser un tratamiento a alta temperatura/tiempo corto (HTST, por sus siglas en inglés) o un tratamiento a temperatura ultraalta (UHT, por sus siglas en inglés).

Los microorganismos probióticos se someten a un tratamiento a alta temperatura a 71,5-150 °C durante un periodo corto de 1-120 segundos.

De forma más preferida, los microorganismos pueden someterse a un tratamiento a alta temperatura a alrededor de 90-140°C, por ejemplo 90-120°C, durante un periodo corto de alrededor de 1-30 segundos.

Este tratamiento a alta temperatura hace a los microorganismos no replicantes, al menos en parte.

El tratamiento a alta temperatura puede llevarse a cabo a presión atmosférica normal, pero también puede llevarse a cabo a alta presión. Los intervalos de presión típicos son de 1 a 50 bares, preferentemente de 1-10 bares, aún más preferentemente de 2 a 5 bares. Obviamente, se prefiere si los probióticos se tratan con calor en un medio que es bien líquido o bien sólido, cuando se aplica el calor. Una presión ideal para aplicar dependerá, por tanto, de la naturaleza de la composición cuando se proporcionan los microorganismos en ella y de la temperatura usada.

El tratamiento a alta temperatura puede llevarse a cabo en el intervalo de temperatura de alrededor de 71,5-150 °C, preferentemente de alrededor de 90-120 °C, aún más preferentemente de alrededor de 120-140 °C.

Los tratamientos a alta temperatura se llevan a cabo durante un periodo corto de alrededor de 1-120 segundos, preferentemente, de alrededor de 1-30 segundos, aún más preferentemente de alrededor de 5-15 segundos.

Este periodo de tiempo dado se refiere al tiempo durante el que los microorganismos probióticos se someten a la temperatura dada. Véase, que dependiendo de la naturaleza y cantidad de la composición, los microorganismos se proporcionan en ella, y dependiendo de la arquitectura del aparato calentador usado, el tiempo de aplicación del calor puede diferir.

La fórmula de alimentación infantil de la presente invención y/o los microorganismos se tratan mediante un tratamiento de pasteurización relámpago a alta temperatura y tiempo corto (HTST) o a un tratamiento de pasteurización ultraalta (UHT).

Un tratamiento UHT es un procesamiento a temperatura ultraalta o un tratamiento ultratérmico (ambos abreviados como UHT) que implica la esterilización al menos parcial de una composición calentándola durante un tiempo corto, de alrededor de 1-10 segundos, a una temperatura que excede los 135 °C (275 °F), que es la temperatura necesaria para destruir las esporas bacterianas en la leche. Por ejemplo, el procesamiento de la leche de esta manera usando temperaturas que exceden los 135 °C permite un descenso de la carga bacteriana en el tiempo de retención necesario (hasta 2-5 s) posibilitando una operación de flujo continuo.

Existen dos tipos principales de sistemas UHT: los sistemas directo e indirecto. En el sistema directo, los productos se tratan mediante inyección de vapor o infusión de vapor, mientras que en el sistema indirecto, los productos se tratan con calor usando un intercambiador de calor de placas, intercambiador de calor tubular o intercambiador de calor de superficie rascada. Pueden aplicarse combinaciones de sistemas UHT en cualquier etapa o en múltiples etapas del proceso de preparación del producto.

Un tratamiento HTST se define de la forma siguiente (alta temperatura/tiempo corto): Método de pasteurización diseñado para alcanzar una reducción de 5 unidades logarítmicas, destruyendo el 99,999 % del número de microorganismos viables de la leche. Esto se considera adecuado para destruir casi todas las levaduras, mohos y bacterias alterantes comunes y también garantiza la destrucción adecuada de organismos patógenos comunes termorresistentes. En el procedimiento HTST la leche se calienta a 71,7 °C (161 °F) durante 15-20 segundos.

La pasteurización relámpago es un método de pasteurización térmica de bebidas perecederas tales como zumos de frutas y verduras, cerveza y productos lácteos. Se realiza antes de llenar los envases a fin de destruir los microorganismos alterantes, hacer los productos más seguros y prolongar su periodo de caducidad. El líquido se mueve en un flujo continuo controlado mientras se somete a temperaturas de 71,5 °C (160 °F) a 74 °C (165 °F) durante alrededor de 15 a 30 segundos.

Para los fines de la presente invención, la expresión "tratamiento durante tiempo corto a alta temperatura" incluirá tratamientos a alta temperatura a tiempo corto, tratamientos UHT, y pasteurización relámpago, por ejemplo.

Dado que dicho tratamiento térmico proporciona probióticos no replicantes con un perfil antiinflamatorio mejorado, la fórmula de alimentación infantil de la presente invención puede ser para uso en la prevención o el tratamiento de trastornos inflamatorios.

Los trastornos inflamatorios que pueden tratarse o prevenirse mediante la fórmula de alimentación infantil de la presente invención no están particularmente limitados. Por ejemplo, pueden seleccionarse del grupo que consiste en inflamaciones agudas tales como sepsis; quemaduras; e inflamación crónica, tal como enfermedad inflamatoria intestinal, p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reservoritis; enterocolitis necrotizante, inflamación de la piel, tal como inflamación de la piel inducida por UV o productos químicos, eccema, piel reactiva; síndrome del intestino irritable, inflamación ocular; alergia, asma; y combinaciones de las mismas.

Aunque la técnica previa enseña generalmente que las bacterias hechas no replicantes mediante tratamientos térmicos a periodos largos suelen ser menos eficaces que las bacterias vivas en cuanto a ejercer sus propiedades probióticas, los presentes inventores fueron capaces de demostrar que los probióticos tratados con calor son superiores al estimular el sistema inmunitario en comparación con sus homólogos vivos.

La presente invención también se relaciona con una fórmula de alimentación infantil que comprende microorganismos probióticos que se hicieron no replicantes mediante un tratamiento térmico a 71,5-150 °C durante 1-120 segundos.

Los efectos de refuerzo inmunitario de los probióticos no replicantes se confirmaron mediante la identificación *in vitro* del perfil inmunológico. El modelo *in vitro* usado usa la identificación del perfil de citocinas de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas y está bien aceptado en la técnica como el modelo de referencia para los análisis de compuestos inmunomoduladores (Schultz et al., 2003, Journal of Dairy Research 70, 165-173; Taylor et al., 2006, Clinical and Experimental Allergy, 36, 1227-1235; Kekkonen et al., 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192-1203).

El ensayo de CMSP *in vitro* ha sido usado por varios autores/equipos de investigación, por ejemplo, para clasificar los probióticos de acuerdo con su perfil inmunológico, es decir, sus características anti o proinflamatorias (Kekkonen et al., 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192-1203). Por ejemplo, se ha demostrado que este ensayo permite la predicción de un efecto antiinflamatorio de candidatos probióticos en modelos de ratón de colitis intestinal (Foligne, B., et al., 2007, World J. Gastroenterol. 13:236-243). Además, este ensayo se usa regularmente como lectura en ensayos clínicos y se demostró que conducía a resultados coherentes con los resultados clínicos (Schultz et al., 2003, Journal of Dairy Research 70, 165-173; Taylor et al., 2006, Clinical and Experimental Allergy, 36, 1227-1235).

Las enfermedades alérgicas han aumentado uniformemente a lo largo de las pasadas décadas y actualmente están consideradas como epidémicas por la OMS. De forma general, se considera que la alergia es el resultado de un desequilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 del sistema inmunitario que conduce a un fuerte sesgo hacia la producción de mediadores de Th2. Por lo tanto, la alergia puede mitigarse, regularse negativamente o prevenirse restaurando un equilibrio apropiado entre las ramas Th1 y Th2 del sistema inmunitario. Esto implica la necesidad de reducir las respuestas Th2 o potenciar, al menos de forma transitoria, las respuestas Th1. Lo último podría ser característico de una respuesta de refuerzo inmunitario, a menudo acompañada, por ejemplo, de niveles mayores de IFN γ , TNF- α e IL-12. (Kekkonen et al., 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192-1203; Viljanen M. et al., 2005, Allergy, 60, 494-500).

La fórmula de alimentación infantil de la presente invención permite, por tanto, tratar o prevenir trastornos que están relacionados con una defensa inmunitaria deprimida.

En consecuencia, los trastornos ligados a una defensa deprimida que pueden tratarse o prevenirse mediante la fórmula de alimentación infantil de la presente invención no están particularmente limitados.

Por ejemplo, pueden seleccionarse del grupo que consiste en infecciones, en particular infecciones bacterianas, víricas, fúngicas y/o parasitarias; deficiencias fagocitarias; niveles de inmunodepresión de leves a graves, tales como los inducidos por estrés o fármacos inmunodepresores, quimioterapia o radioterapia; estados naturales de sistemas inmunitarios menos inmunocompetentes tales como los de los neonatos; alergias; y combinaciones de las mismas.

La fórmula de alimentación infantil descrita en la presente invención permite también potenciar la respuesta del lactante a las vacunas, en particular a las vacunas orales.

Será eficaz cualquier cantidad de microorganismos no replicantes. Sin embargo, se prefiere generalmente, si al menos el 90 %, preferentemente, al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %, idealmente al menos el 99 %, lo más idealmente todos los probióticos son no replicantes.

5 En una realización de la presente invención todos los microorganismos son no replicantes.

En consecuencia, en la fórmula de alimentación infantil de la presente invención al menos el 90 %, preferentemente, al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %, idealmente al menos el 99,9 %, lo más idealmente todos los probióticos son no replicantes.

10 Todos los microorganismos probióticos pueden usarse para el fin de la presente invención.

Por ejemplo, los microorganismos probióticos pueden seleccionarse del grupo que consiste en bifidobacterias, lactobacilos propionibacterias, o combinaciones de los mismos, por ejemplo, *Bifidobacterium longum*,
 15 *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*
 20 y/o mezclas de los mismos.

La fórmula de alimentación infantil de acuerdo con la presente invención puede, por ejemplo, comprender el grupo de microorganismos probióticos seleccionados del grupo que consiste 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* DSM17938, *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, o combinaciones de los mismos.

30 Todas estas cepas se depositaron bajo el Tratado de Budapest, y/o están disponibles comercialmente.

Las cepas se han depositado bajo el Tratado de Budapest de la forma siguiente:

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

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

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 DSM17938 DSM17938

Lactobacillus reuteri ATCC55730 ATCC55730

Escherichia coli Nissle 1917: DSM 6601

Otras ventajas y aspectos de la presente invención son evidentes a partir de los siguientes ejemplos y figuras:

5 Las figuras 1A y B muestran la potenciación de los perfiles inmunitarios antiinflamatorios de los probióticos tratados con "tiempo corto a altas temperaturas".

10 La figura 2 muestra cepas probióticas no antiinflamatorias que se vuelven antiinflamatorias, es decir, presentan marcados perfiles inmunitarios antiinflamatorios *in vitro* después de ser tratadas con "tiempo corto a altas temperaturas".

15 Las figuras 3A y 3B muestran cepas probióticas de uso en productos disponibles comercialmente que presentan perfiles inmunitarios antiinflamatorios potenciados o nuevos *in vitro* después de haber sido tratadas con "tiempo corto a altas temperaturas".

20 Las figuras 4A y B muestran cepas de inóculo lácteas (es decir, cepas de inóculo Lc1) que presentan perfiles inmunitarios antiinflamatorios potenciados o nuevos *in vitro* después del tratamiento térmico a altas temperaturas.

La figura 5 muestra una cepa probiótica no antiinflamatoria que presenta perfiles inmunitarios antiinflamatorios *in vitro* después de ser tratada con tratamientos HTST.

25 Figura 6: Análisis de componentes principales de los datos de CMSP (IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-10) generados con cepas de inóculo probióticas y lácteas en sus formas vivas y tratadas con calor (140 °C durante 15 segundos). Cada punto representa una cepa, bien viva o bien tratada con calor, identificada mediante su número NCC o su nombre.

30 La figura 7 muestra las proporciones IL-12p40 / IL-10 de las cepas vivas y tratadas con calor (85 °C, 20 min). De forma global, el tratamiento térmico a 85°C durante 20 min conduce a un aumento de las proporciones IL-12p40 / IL-10 en contraposición con los tratamientos "a tiempo corto a alta temperatura" de la presente invención (figuras 1, 2, 3, 4 y 5).

35 La figura 8 muestra la potenciación de la secreción de citocinas *in vitro* a partir de CMSP humanas estimulada con bacterias tratadas con calor.

La figura 9 muestra el porcentaje de la intensidad de la diarrea observado en ratones sensibilizados a OVA estimulados con solución salina (control negativo), ratones sensibilizados a OVA estimulados con OVA (control positivo) y ratones sensibilizados a OVA estimulados con OVA y tratados con *Bifidobacterium breve* NCC2950 tratado con calor o vivo. Los resultados se muestran como porcentaje de intensidad de la diarrea (Media $\pm$ ETM, calculado a partir de 4 experimentos independientes) con el 100 % de intensidad de la diarrea correspondiente a los síntomas desarrollados en el grupo de control positivo (sensibilizado y estimulado mediante el alérgeno).

40 Ejemplo 1:

Metodología

Preparaciones bacterianas:

45 En general, se considera que los beneficios para la salud proporcionados al sistema inmunitario del anfitrión por los probióticos vivos son específicos de la cepa. Se ha demostrado que los probióticos que inducen altos niveles de IL-10 y/o que inducen bajos niveles de citocinas proinflamatorias *in vitro* (ensayo de CMSP) son potentes cepas antiinflamatorias *in vivo* (Foligné, B., et al., 2007, World J. Gastroenterol. 13:236-243).

50 Se usaron varias cepas probióticas para investigar las propiedades antiinflamatorias de los probióticos tratados con calor. 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. También se analizaron varias cepas de inóculo, incluyendo algunas cepas usadas 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.

60 Las células bacterianas se cultivaron en condiciones optimizadas para cada cepa en biorreactores de 5-15 l. Son utilizables todos los medios de crecimiento bacteriano típicos. Dichos medios son conocidos por los expertos en la técnica. Cuando el pH se ajustó a 5,5, se añadió una solución de base al 30 % (bien NaOH o bien Ca(OH)₂) de forma continua. Cuando fue adecuado, las condiciones anaerobias se mantuvieron gaseando el espacio de cabeza

con CO₂. Se cultivó *E. coli* en condiciones aerobias convencionales.

Las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación (5.000 x g, 4 °C) y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en volúmenes adecuados a fin de alcanzar una concentración final de alrededor de 10⁹ -10¹⁰ ufc/ml. Parte de la preparación se congeló a -80 °C con glicerol al 15 %. Otra parte de las células se trató con calor mediante:

- Temperatura ultra alta: 140 °C durante 15 seg; mediante inyección indirecta de vapor

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

- Largo tiempo a baja temperatura (85 °C, 20 min) en baño de agua

Tras el tratamiento térmico, las muestras se conservaron congeladas a -80 °C hasta su uso.

Identificación *in vitro* del perfil inmunológico de las preparaciones bacterianas:

Se evaluaron los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas vivas y tratadas con calor (es decir, la capacidad de inducir *in vitro* secreción de citocinas específicas a partir de células sanguíneas humanas). Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas se aislaron a partir de filtros de sangre. Después de la separación mediante gradiente de densidad celular, las células mononucleares se recogieron y se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank. Las células se resuspendieron después en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Sigma) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Bioconcept, París, Francia), L-glutamina al 1 % (Sigma), penicilina/estreptomicina al 1 % (Sigma) y gentamicina al 0,1 % (Sigma). Las CMSP (7x10⁵ células/pocillo) se incubaron después con bacterias vivas y tratadas con calor (equivalente a 7x10⁶ ufc/pocillo) en placas de 48 pocillos durante 36 h. Los efectos de las bacterias vivas y tratadas con calor se analizaron en CMSP de 8 donantes individuales divididas en dos experimentos separados. Después de 36 horas de incubación, las placas de cultivo se congelaron y se conservaron a -20 °C hasta la medición de las citocinas. La identificación del perfil de citocinas se realizó en paralelo (es decir, en el mismo experimento sobre el mismo lote de CMSP) para las bacterias vivas y sus homólogas tratadas con calor.

Los niveles de citocinas (IFN-γ, IL-12p40, TNF-α e IL-10) en los sobrenadantes de cultivo celular después de 36 h de incubación se determinaron mediante ELISA (R&D DuoSet Human IL-10, BD OptEIA Human IL12p40, BD OptEIA Human TNFα, BD OptEIA Human IFN-γ) siguiendo las instrucciones del fabricante. IFN-γ, IL-12p40 y TNF-α son citocinas proinflamatorias, mientras que IL-10 es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados se expresan como medias (pg/ml) +/- ETM de 4 donantes individuales y son representativos de dos experimentos individuales realizados con 4 donantes cada uno. La proporción IL-12p40/IL-10 se calcula para cada cepa como un valor predictivo del efecto antiinflamatorio *in vivo* (Foligné, B., et al., 2007, World J. Gastroenterol. 13:236-243).

Los valores numéricos de las citocinas (pg/ml) determinados por ELISA (véase lo anterior) para cada cepa se transfirieron al programa informático BioNumerics v5.10 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP, técnica de dimensionamiento) en este conjunto de datos. Se incluyeron en este análisis la sustracción de las medias en relación con los caracteres y la división por las varianzas en relación con los caracteres.

Resultados

Perfiles antiinflamatorios generados mediante tratamientos de tipo temperatura ultraalta (UHT)/alta temperatura a tiempo corto (HTST)

Las cepas probióticas en investigación se sometieron a una serie de tratamientos térmicos (temperatura ultraalta (UHT), alta temperatura a tiempo corto (HTST) y 85 °C durante 20 min) y sus perfiles inmunológicos se compararon *in vitro* con los de células vivas. Los microorganismos vivos (inóculos probióticos y/o lácteos) indujeron diferentes niveles de producción de citocinas cuando se incubaron con CMSP (figuras 1, 2, 3, 4 y 5). El tratamiento térmico de estos microorganismos modificó los niveles de citocinas producidas por las CMSP de una manera dependiente de la temperatura. Los tratamientos "a tiempo corto de alta temperatura" (120 °C o 140 °C durante 15") generaron bacterias no replicantes con perfiles inmunológicos antiinflamatorios (figuras 1, 2, 3 y 4). De hecho, las cepas con tratamiento de tipo UHT (140 °C, 15 seg) indujeron menos citocinas proinflamatorias (TNF-α, IFN-γ, IL-12p40) al tiempo que mantenían o inducían la producción adicional de IL-10 (en comparación con sus homólogas vivas). Las proporciones IL-12p40 / IL-10 resultantes fueron inferiores para cualquier cepa con tratamiento de tipo UHT en comparación con las células vivas (figuras 1, 2, 3 y 4). Esta observación también fue válida para las bacterias tratados mediante tratamientos de tipo HTST, es decir, sometidas a 120 °C durante 15 seg (figuras 1, 2, 3 y 4), o a 74 °C y 90 °C durante 15 seg (figura 5). Los tratamientos térmicos (tratamientos de tipo UHT o de tipo HTST) tuvieron un efecto similar sobre los perfiles inmunológicos *in vitro* de las cepas probióticas (figuras 1, 2, 3 y 5) y los inóculos lácteos (figura 4). El Análisis de Componentes Principales de los datos de CMSP generados con las cepas

probióticas y de inóculo vivas y tratadas con calor (140 °C, 15") reveló que las cepas vivas se diseminan por todo el eje x, ilustrando que las cepas presentan perfiles inmunológicos *in vitro* muy diferentes, desde inductores bajos (lado izquierdo) hasta altos (lado derecho) de citocinas proinflamatorias. Las células tratadas con calor se agrupan en el lado izquierdo de la gráfica, lo que demuestra que las cepas tratadas con calor inducen muchas menos citocinas proinflamatorias (figura 6). Por el contrario, las bacterias tratadas con calor a 85 °C durante 20 min indujeron más citocinas proinflamatorias y menos IL-10 que las células vivas, lo que resulta en proporciones IL-12p40 / IL-10 mayores (figura 7).

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

Las cepas tratados con UHT y HTST presentan perfiles antiinflamatorios independientemente de sus respectivos perfiles inmunológicos iniciales (células vivas). Se demostró que las cepas probióticas que se sabía que eran antiinflamatorias *in vivo* y presentaban perfiles antiinflamatorios *in vitro* (*B. longum* NCC 3001, *B. longum* NCC 2705, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818) presentaban perfiles antiinflamatorios potenciados *in vitro* después de tratamientos "a tiempo corto a alta temperatura". Tal como se muestra en la figura 1, las proporciones IL-12p40/IL-10 de las cepas de *Bifidobacterium* con tratamiento de tipo UHT fueron inferiores a las de sus homólogas vivas, lo que demostraba así los perfiles antiinflamatorios potenciados de las muestras con tratamiento de tipo UHT. Más sorprendentemente, la generación de perfiles antiinflamatorios mediante tratamientos de tipo UHT y de tipo HTST también se confirmó para las cepas vivas no antiinflamatorias. Tanto *L. rhamnosus* NCC 4007 como *L. paracasei* NCC 2461 vivos presentan proporciones IL-12p40 / IL-10 altas *in vitro* (figuras 2 y 5). Se demostró que ninguna de las dos cepas vivas era protectora contra la colitis inducida por TNBS en ratones. Las proporciones IL-12p40 / IL-10 inducidas por *L. rhamnosus* NCC 4007 y *L. paracasei* NCC 2461 se redujeron drásticamente después de tratamientos "a tiempo corto a alta temperatura" (UHT o HTST) alcanzando niveles tan bajos como los obtenidos con las cepas de *Bifidobacterium*. Estas bajas proporciones IL-12p40 / IL-10 se deben a niveles bajos de producción de IL-12p40 combinada con una ausencia de modificación (*L. rhamnosus* NCC 4007) o una inducción drástica de la secreción de IL-10 (*L. paracasei* NCC 2461) (figura 2).

Como consecuencia:

- Pueden potenciarse perfiles antiinflamatorios de microorganismos vivos mediante tratamientos térmicos de tipo UHT y de tipo HTST (por ejemplo, *B. longum* NCC 2705, *B. longum* NCC 3001, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818).

- Pueden generarse perfiles antiinflamatorios a partir de microorganismos vivos no antiinflamatorios (por ejemplo, *L. rhamnosus* NCC 4007, *L. paracasei* NCC 2461, inóculos lácteos *S. thermophilus* NCC 2019) mediante tratamientos térmicos de tipo UHT y de tipo HTST.

- También se demostraron perfiles antiinflamatorios para cepas aisladas de productos disponibles comercialmente (figuras 3A y 3B) incluyendo una cepa probiótica de *E. coli*.

El impacto de los tratamientos de tipo UHT/HTST fue similar para todos los probióticos e inóculos lácteos analizados, por ejemplo lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos.

Los tratamientos de tipo UHT/HTST se aplicaron a varios lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos, presentando diferentes perfiles inmunológicos *in vitro*. Todas las cepas indujeron menos citocinas proinflamatorias después de tratamientos de tipo UHT/HTST que sus homólogas vivas (figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6) lo que demuestra que el efecto de los tratamientos de tipo UHT/HTST sobre las propiedades inmunológicas de las bacterias no replicantes resultantes puede generalizarse a todos los probióticos, en particular a lactobacilos y bifidobacterias y cepas específicas de *E. coli* y a todos los inóculos lácteos, en particular a estreptococos, lactococos y lactobacilos.

Ejemplo 2:

Metodología

Preparaciones bacterianas:

Se usaron cinco cepas probióticas para investigar las propiedades de refuerzo inmunológico 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).

Las células bacterianas se cultivaron en MRS en fermentación discontinua a 37 °C durante 16-18 h sin control de pH. Las células bacterianas se precipitaron (5.000 x g, 4 °C) y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato antes de diluirse en solución salina acuosa para alcanzar una concentración final de alrededor de 10E10 ufc/ml. *B. longum* NCC3001, *B. lactis* NCC2818, *L. paracasei* NCC2461, *L. rhamnosus* NCC4007 se trataron con calor a 85°C durante 20 min en un baño de agua. *B. breve* NCC2950 se trató con calor a 90°C durante 20 min en un baño de agua. Las suspensiones bacterianas tratadas con calor se separaron en alícuotas y se conservaron

congeladas a -80 °C hasta su uso. Las bacterias vivas se almacenaron a -80°C en PBS-glicerol al 15 % hasta su uso.

Identificación in vitro del perfil inmunológico de las preparaciones bacterianas

Se evaluaron los perfiles inmunológicos de las preparaciones bacterianas vivas y tratadas con calor (es decir, la capacidad de inducir *in vitro* secreción de citocinas específicas a partir de células sanguíneas humanas). Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas se aislaron a partir de filtros de sangre. Después de la separación mediante gradiente de densidad celular, las células mononucleares se recogieron y se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank. Las células se resuspendieron después en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Sigma) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Bioconcept, París, Francia), L-glutamina al 1 % (Sigma), penicilina/estreptomina al 1 % (Sigma) y gentamicina al 0,1 % (Sigma). Las CMSP (7×10^5 células/pocillo) se incubaron después con bacterias vivas y tratadas con calor (equivalente a 7×10^6 ufc/pocillo) en placas de 48 pocillos durante 36 h. Los efectos de las bacterias vivas y tratadas con calor se analizaron en CMSP de 8 donantes individuales divididas en dos experimentos separados. Después de 36 horas de incubación, las placas de cultivo se congelaron y se conservaron a -20 °C hasta la medición de las citocinas. La identificación del perfil de citocinas se realizó en paralelo (es decir, en el mismo experimento sobre el mismo lote de CMSP) para las bacterias vivas y sus homólogas tratadas con calor.

Los niveles de citocinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α e IL-10) en los sobrenadantes de cultivo celular después de 36 h de incubación se determinaron mediante ELISA (R&D DuoSet Human IL-10, BD OptEIA Human IL12p40, BD OptEIA Human TNF α , BD OptEIA Human IFN- γ) siguiendo las instrucciones del fabricante. IFN- γ , IL-12p40 y TNF- α son citocinas proinflamatorias, mientras que IL-10 es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados se expresan como medias (pg/ml) $\pm$ ETM de 4 donantes individuales y son representativos de dos experimentos individuales realizados con 4 donantes cada uno.

Efecto in vivo de Bifidobacterium breve NCC2950 vivo y tratado con calor en la prevención de la diarrea alérgica

Se usó un modelo de ratón de diarrea alérgica para analizar el efecto promotor de Th1 de *B. breve* NCC2950 (Brandt E.B et al. JCI 2003; 112(11): 1666-1667). Tras la sensibilización (2 inyecciones intraperitoneales de ovalbúmina (OVA) y sulfato de aluminio potasio a un intervalo de 14 días; los días 0 y 14) se estimularon ratones machos Balb/c por vía oral 6 veces (días 27, 29, 32, 34, 36, 39) dando como resultado síntomas clínicos transitorios (diarrea) y cambios de los parámetros inmunológicos (concentración plasmática de IgE total, IgE total específica de OVA, proteasa 1 de mastocitos de ratón, es decir (MMCP-1, por sus siglas en inglés). Se administró *Bifidobacterium breve* NCC2950 vivo o tratado con calor a 90 °C durante 30 min, mediante sonda oral 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 estimulación (días 23 a 29). Se usó una dosis bacteriana diaria de alrededor de 10^9 unidades formadoras de colonias (ufc) o equivalentes de ufc/ratón.

Resultados

Inducción de la secreción de citocinas proinflamatorias después del tratamiento térmico

Se evaluó *in vitro* la capacidad de cepas bacterianas tratadas con calor para estimular la secreción de citocinas por células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas. Los perfiles inmunológicos basados en cuatro citocinas tras la estimulación de CMSP por bacterias tratadas por calor se compararon con los inducidos por células bacterianas vivas en el mismo ensayo *in vitro*.

Las preparaciones tratadas con calor se sembraron en placa y se evaluó la ausencia de cualquier recuento de viables. Las preparaciones bacterianas tratados con calor no produjeron colonias tras la siembra en placa.

Los probióticos vivos indujeron niveles diferentes y dependientes de la cepa de producción de citocinas cuando se incubaron con CMSP humanas (figura 8). El tratamiento térmico de los probióticos modificó los niveles de las citocinas producidas por las CMSP en comparación con sus homólogos vivos. Las bacterias tratadas con calor indujeron menos citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-12p40) que sus homólogas vivas. Por el contrario, las bacterias tratadas con calor indujeron cantidades de IL-10 similares o inferiores en comparación con las células vivas (figura 8). Estos datos muestran que las bacterias tratadas con calor son más capaces de estimular al sistema inmunitario que sus homólogas vivas y, por tanto, son más capaces de reforzar las defensas inmunitarias debilitadas. En otras palabras, los datos *in vitro* ilustran un efecto de refuerzo inmunitario potenciado de las cepas bacterianas después del tratamiento térmico.

A fin de ilustrar el efecto potenciado sobre el sistema inmunitario de *B. breve* NCC2950 (en comparación con células vivas), tanto *B. breve* NCC2950 (cepa A) vivos como tratados con calor se analizaron en un modelo animal de diarrea alérgica.

En comparación con el grupo de control positivo, la intensidad de la diarrea descendió de forma significativa y sistemática tras el tratamiento con *B. breve* NCC2950 tratado con calor ($41,1 \% \pm 4,8$), mientras que la intensidad de

la diarrea se redujo en solo $20 \pm 28,3$ % después del tratamiento con *B. breve* NCC2950 vivo. Estos resultados demuestran que *B. breve* NCC2950 tratado con calor presenta un efecto protector contra la diarrea alérgica potenciado en relación con su homólogo vivo (figura 9).

- 5 Como consecuencia, se demostró que la capacidad de los probióticos para potenciar las defensas inmunitarias mejoraba después del tratamiento térmico.

Ejemplos 3-6:

- 10 Pueden prepararse las siguientes fórmulas de alimentación infantil

Proteína (g/100 kcal)	1,83	1,83	2,699	2,25
Suero de leche/caseína	70/30	70/30	23/77	45/55
CHO (g/100 kcal)	11,2	11,2	10,2	11,3
Lactosa (g/100 kcal)	11,16	11,2	7,11	4,5
Maltodextrina (g/100 kcal)	-	-	3,11	2,9
Grasa (g/100 kcal)	5,34	5,3	5,37	5,1
Probióticos/g peso seco	10^9 ufc <i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	10^9 ufc <i>Bifidobacterium longum</i> NCC 3001 tratado con calor (75°C, 20min)	10^9 ufc <i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 tratado con UHT	10^9 ufc <i>Bifidobacterium breve</i> NCC 2950 tratado con UHT
AGPCL (0,23g/100 g AG)	AA/ADH	AA/ADH	-	-
Nucleótidos (mg/100 ml)	2	2	-	-
Energía (Kcal/100 ml)	65	65	64,84	65

REIVINDICACIONES

1. Fórmula de alimentación infantil para administrar a lactantes como única fuente de nutrición o como única fuente de nutrición complementaria además de la leche materna que proporciona nutrición completa al lactante y comprende microorganismos probióticos no replicantes, en la que los microorganismos probióticos no replicantes se hicieron no replicantes mediante un tratamiento térmico que es un tratamiento a alta temperatura a 71,5-150 °C durante 1-120 segundos.
2. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tratamiento a alta temperatura se lleva a cabo durante un periodo corto de 1-30 segundos, preferentemente durante 5-15 segundos.
3. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que tiene una densidad calórica en el intervalo de 62-68 kcal/100 ml, y comprende una fuente de proteína en una cantidad de 1,5-2,8 g/100 kcal, una fuente de carbohidratos en una cantidad de 10-12 g/100 kcal, y una fuente de lípidos en una cantidad de 5-5,5 g/100 kcal.
4. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes que comprende 0,2-0,3 g de AGPCL/100g de ácidos grasos, en la que los AGPCL son una combinación de AA y ADH.
5. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes que comprende 1,5-2,5 mg de nucleótidos por 100 ml de fórmula.
6. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes que comprende microorganismos probióticos en una cantidad correspondiente a alrededor de 10^6 a 10^{12} ufc.
7. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tratamiento térmico es un tratamiento a alta temperatura/tiempo corto (HTST) o un tratamiento a temperatura ultraalta (UHT).
8. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la prevención o el tratamiento de trastornos inflamatorios.
9. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos el 90 %, preferentemente, al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 99 %, idealmente al menos el 99,9 %, lo más idealmente todos los probióticos son no replicantes.
10. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que los microorganismos probióticos se seleccionan del grupo que consiste en bifidobacterias, lactobacilos, propionibacterias, o combinaciones de los mismos, 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 diacetylactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y/o mezclas de los mismos.
11. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que los microorganismos probióticos se seleccionan del grupo que consiste 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* DSM17938, *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 o combinaciones de los mismos.
12. Fórmula de alimentación infantil de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, que contiene alrededor de 0,005 mg-1000 mg de microorganismos no replicantes por dosis diaria.

Figura 1A

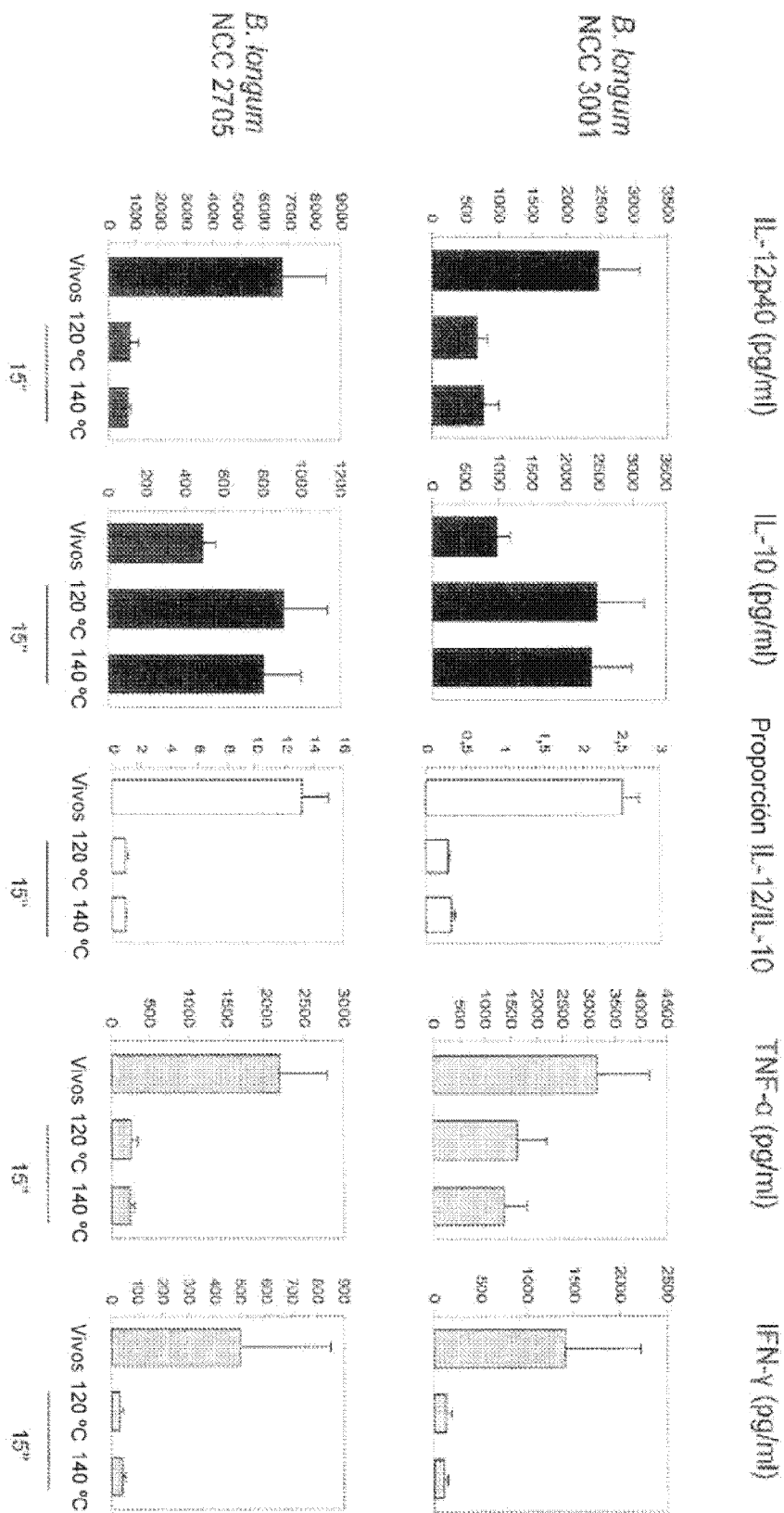


Figura 1B

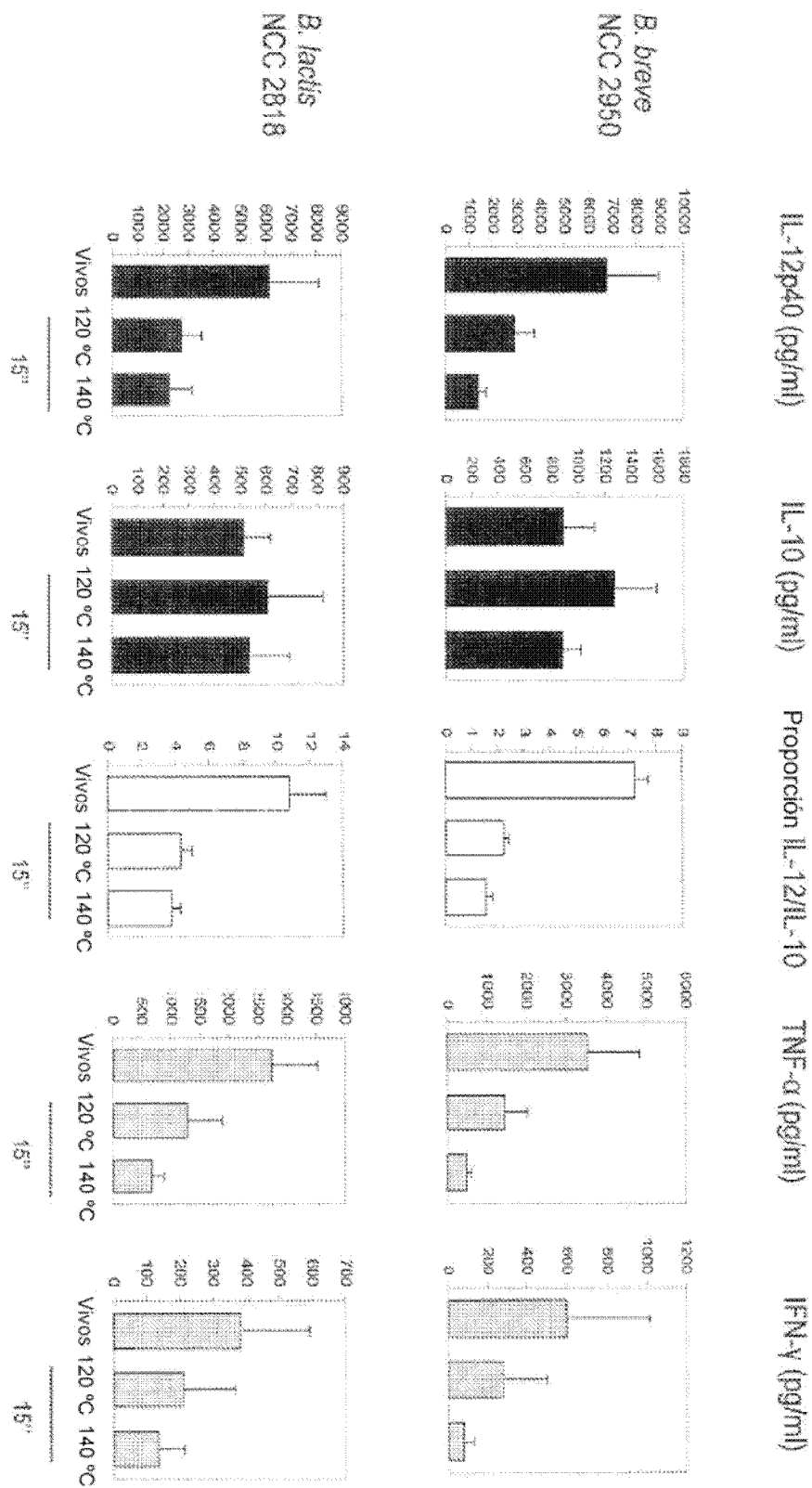


Figura 2

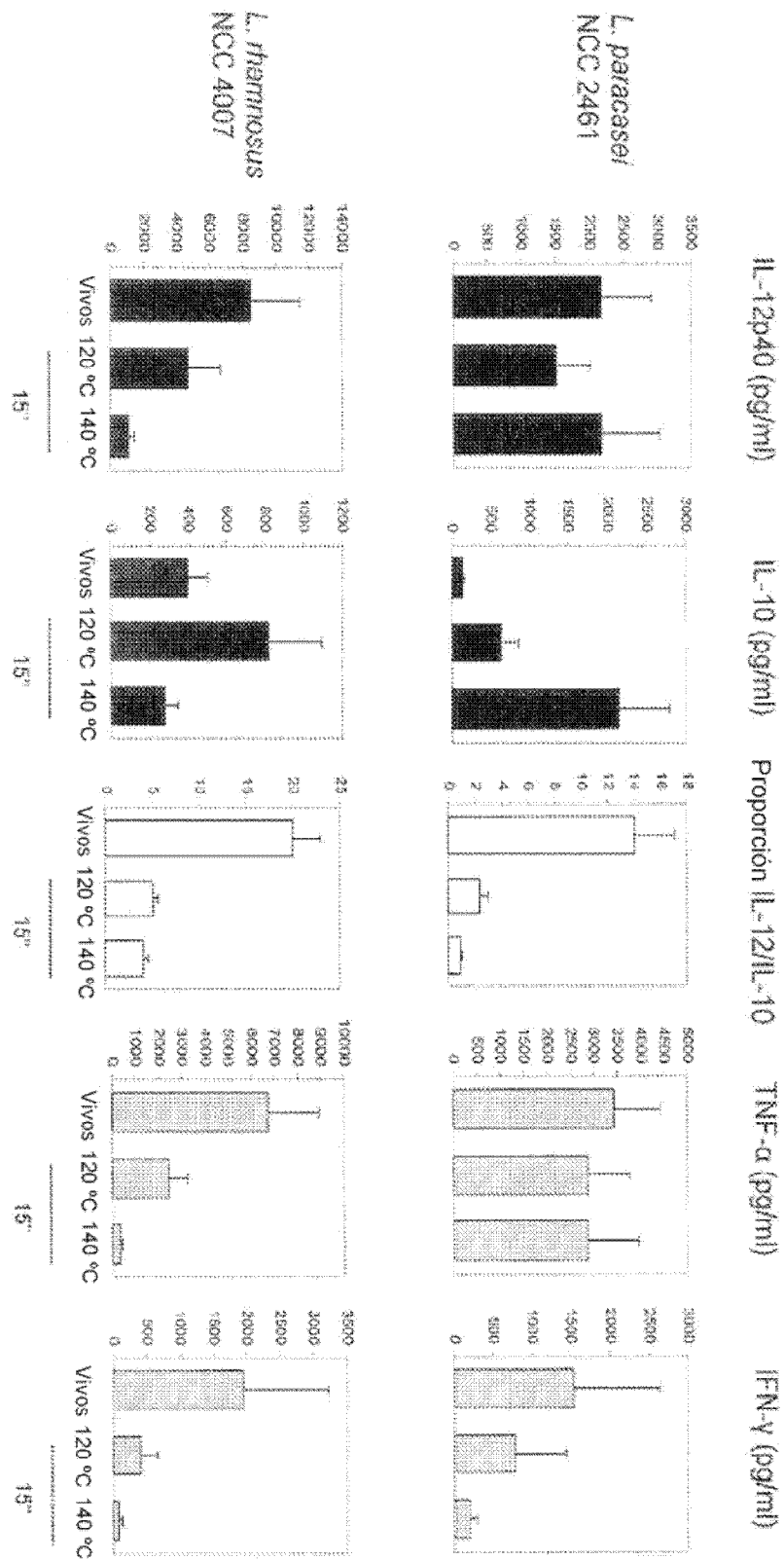


Figura 3A

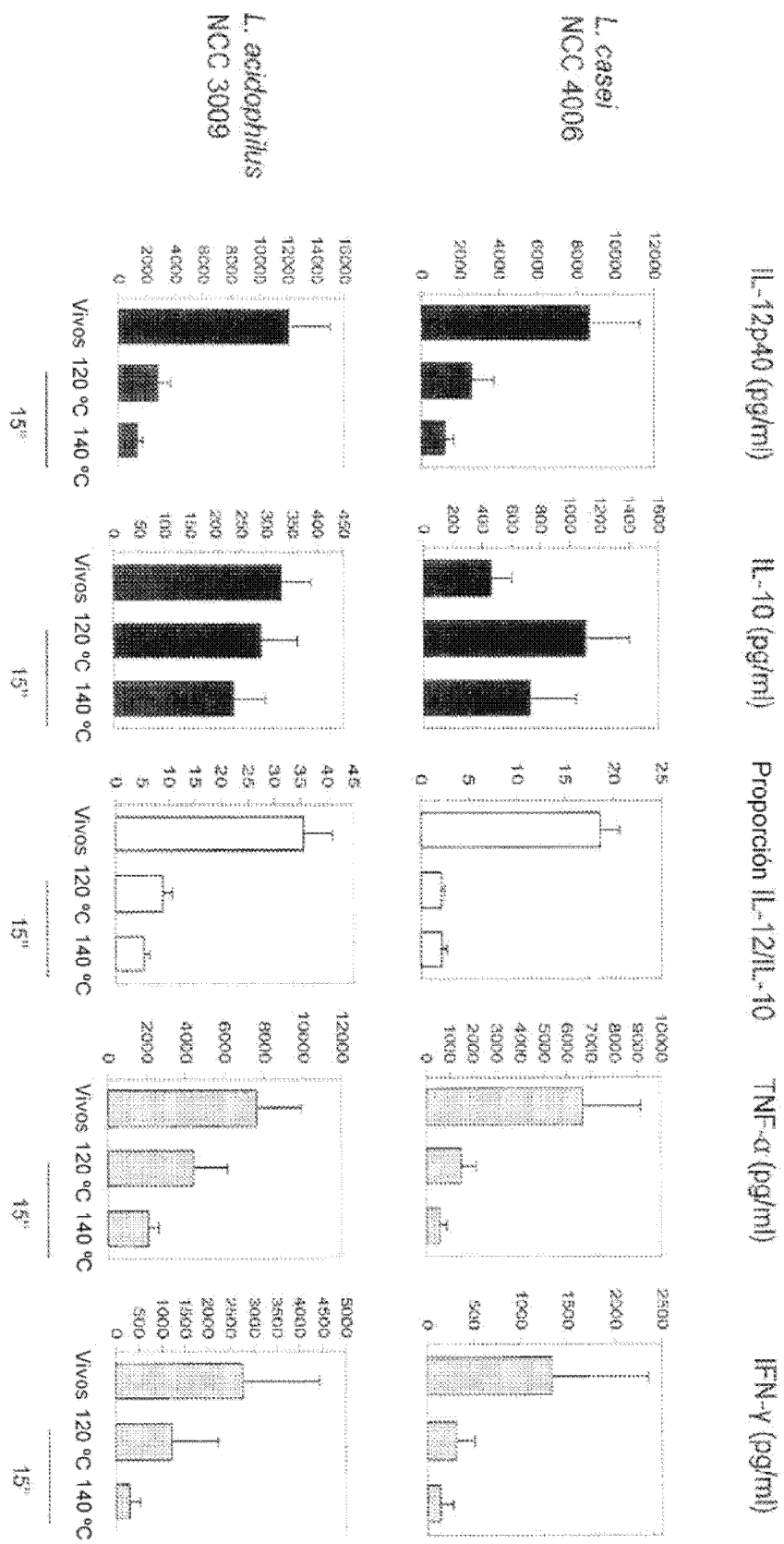


Figura 3B

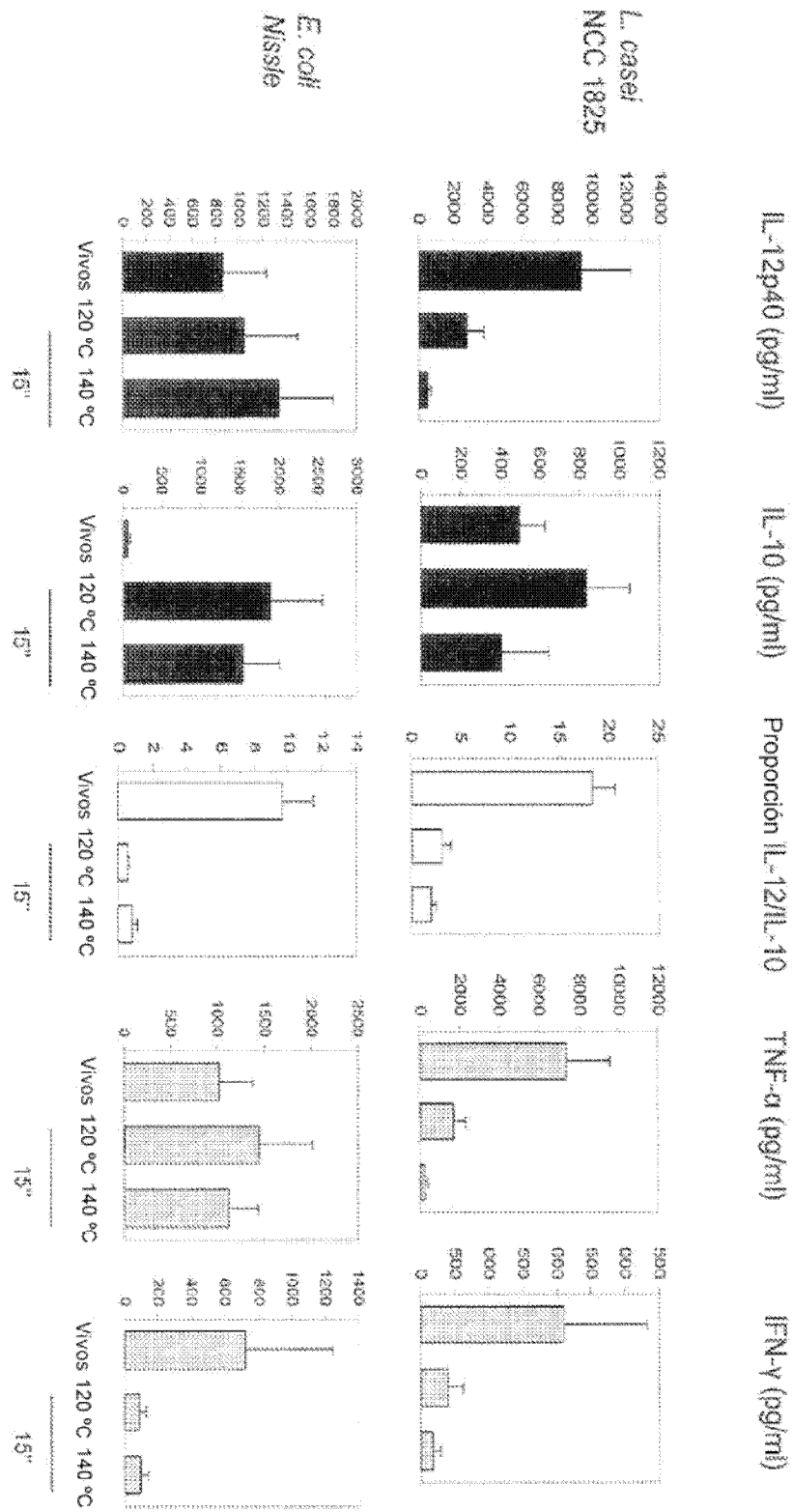


Figura 4A

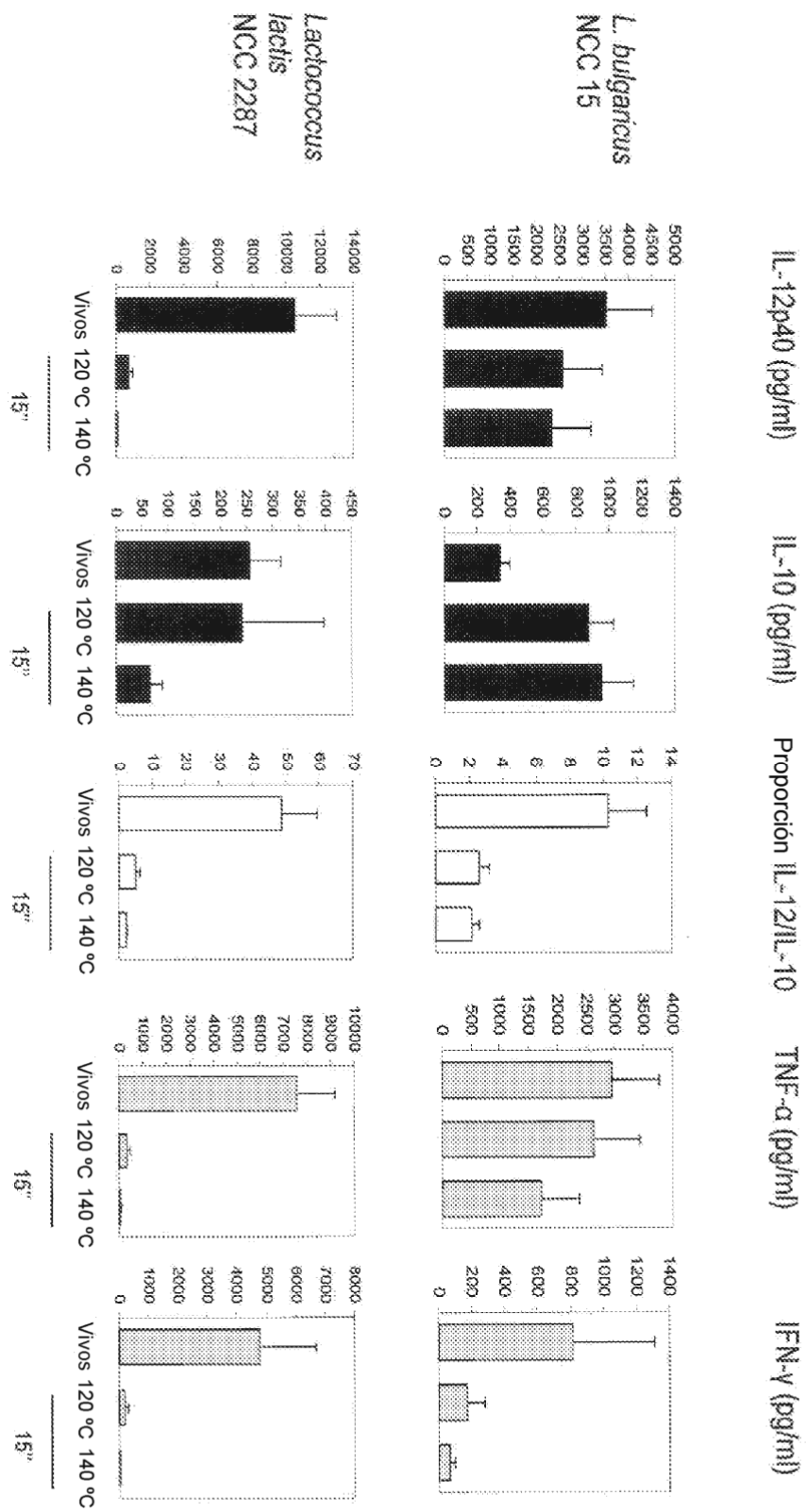


Figura 4B

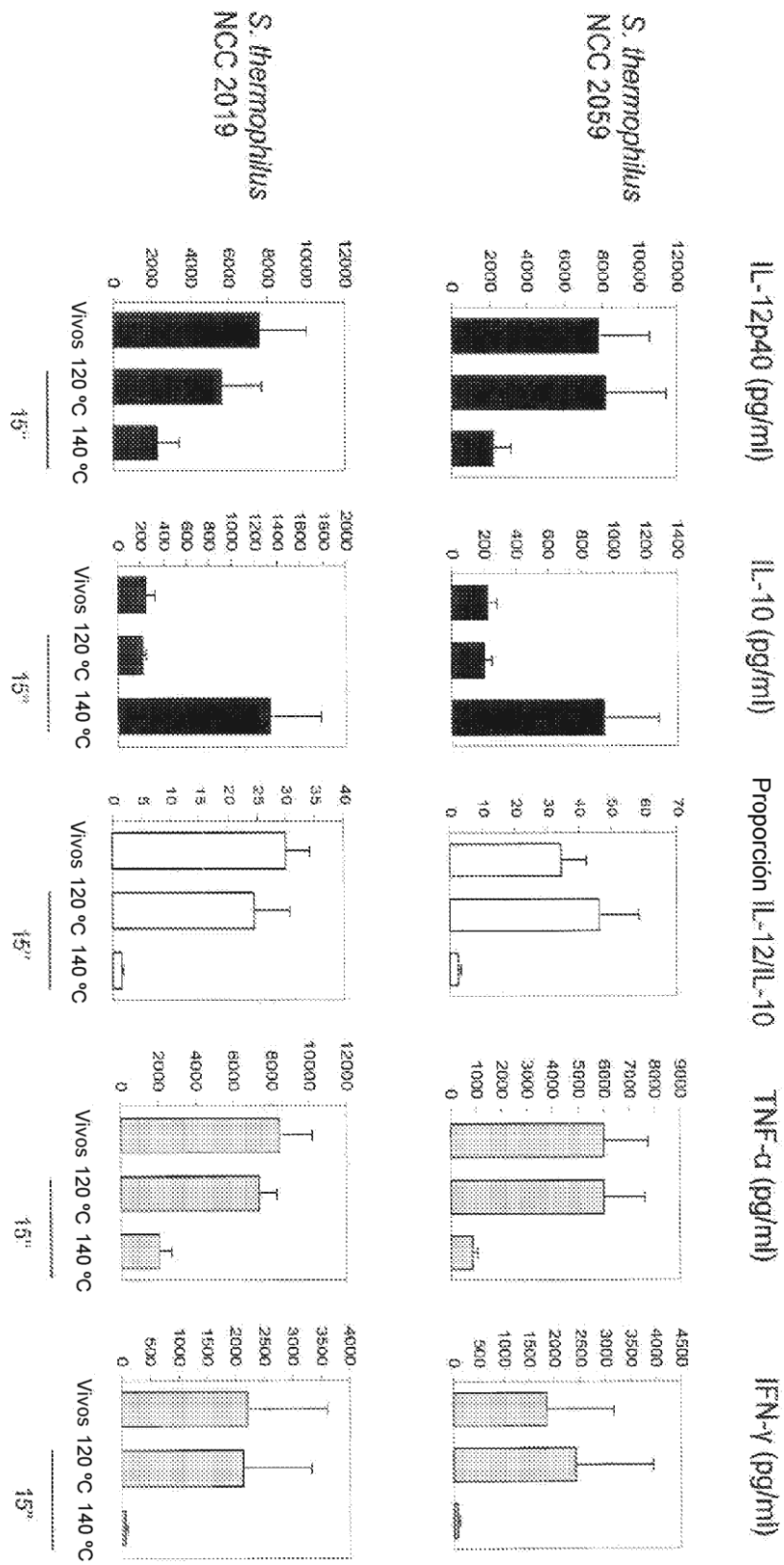


Figura 5

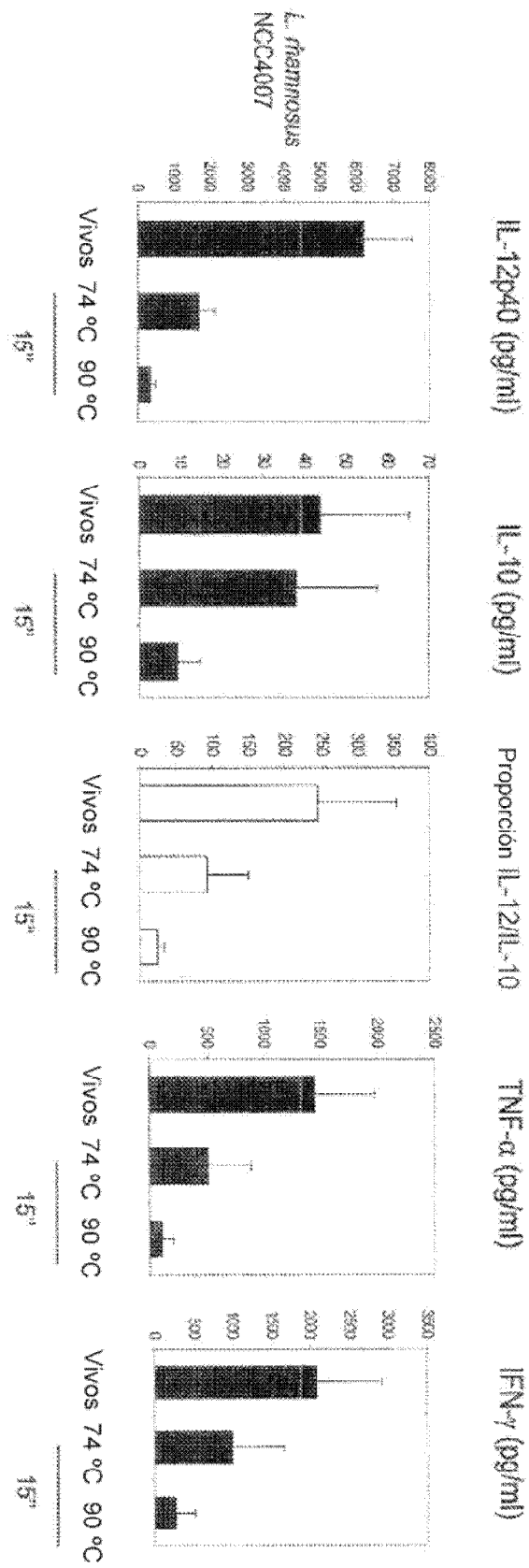


Figura 6

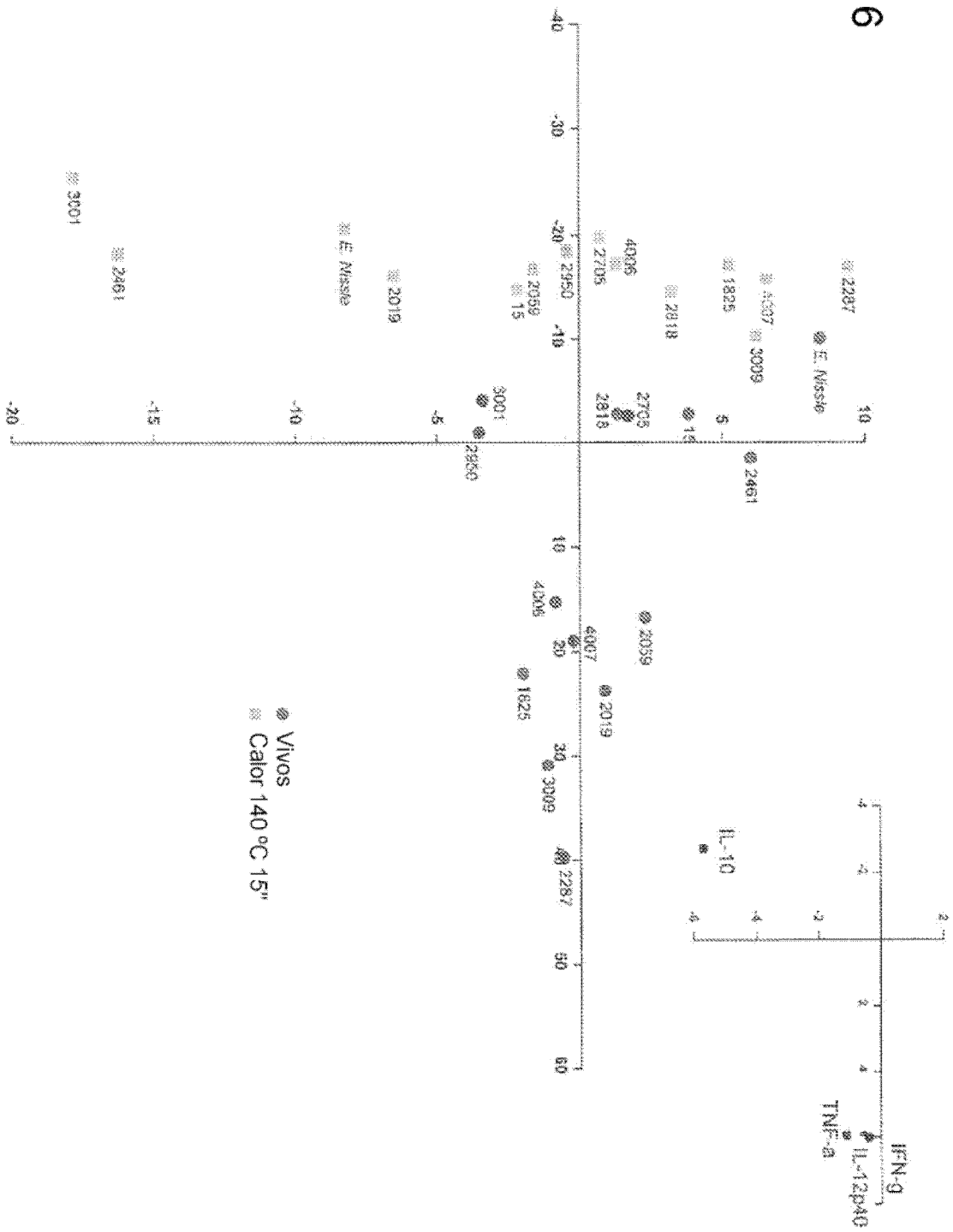


Figura 7

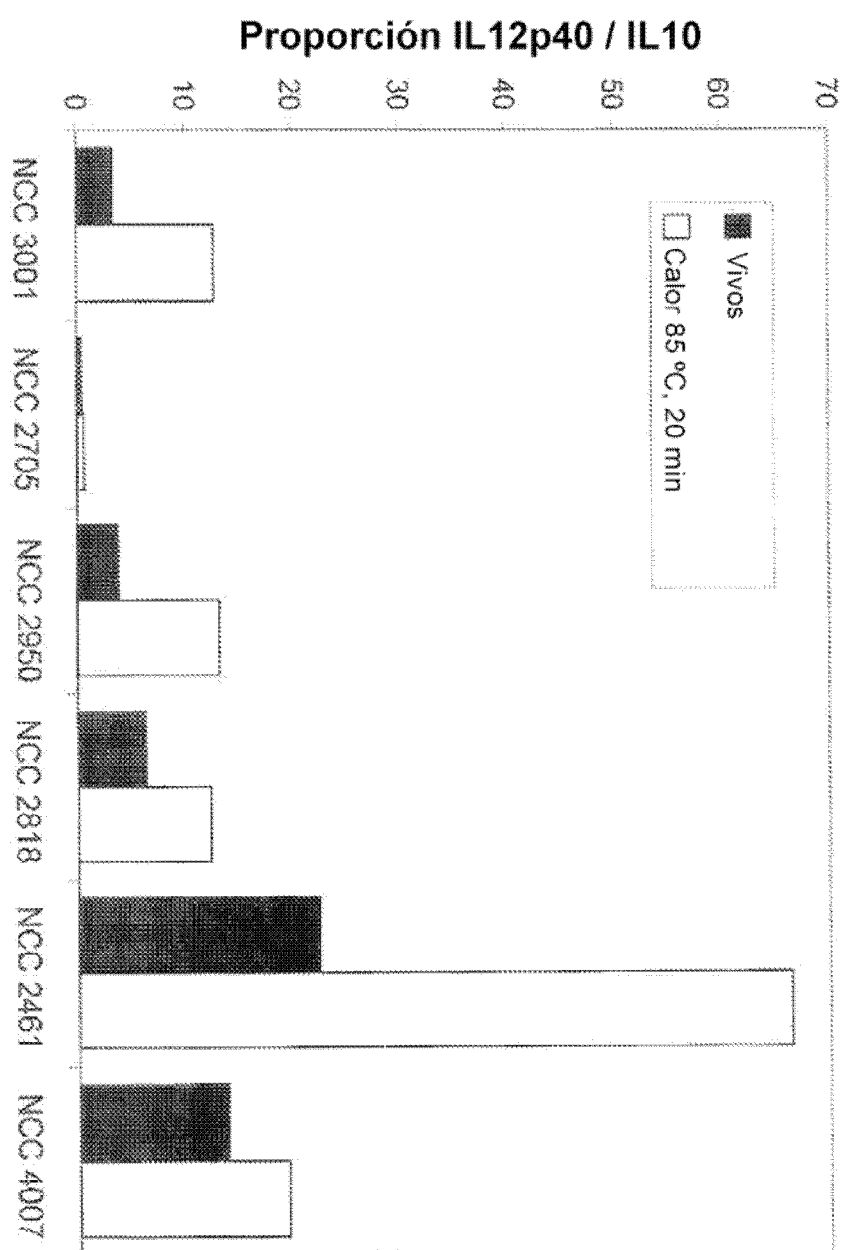


Figura 8:

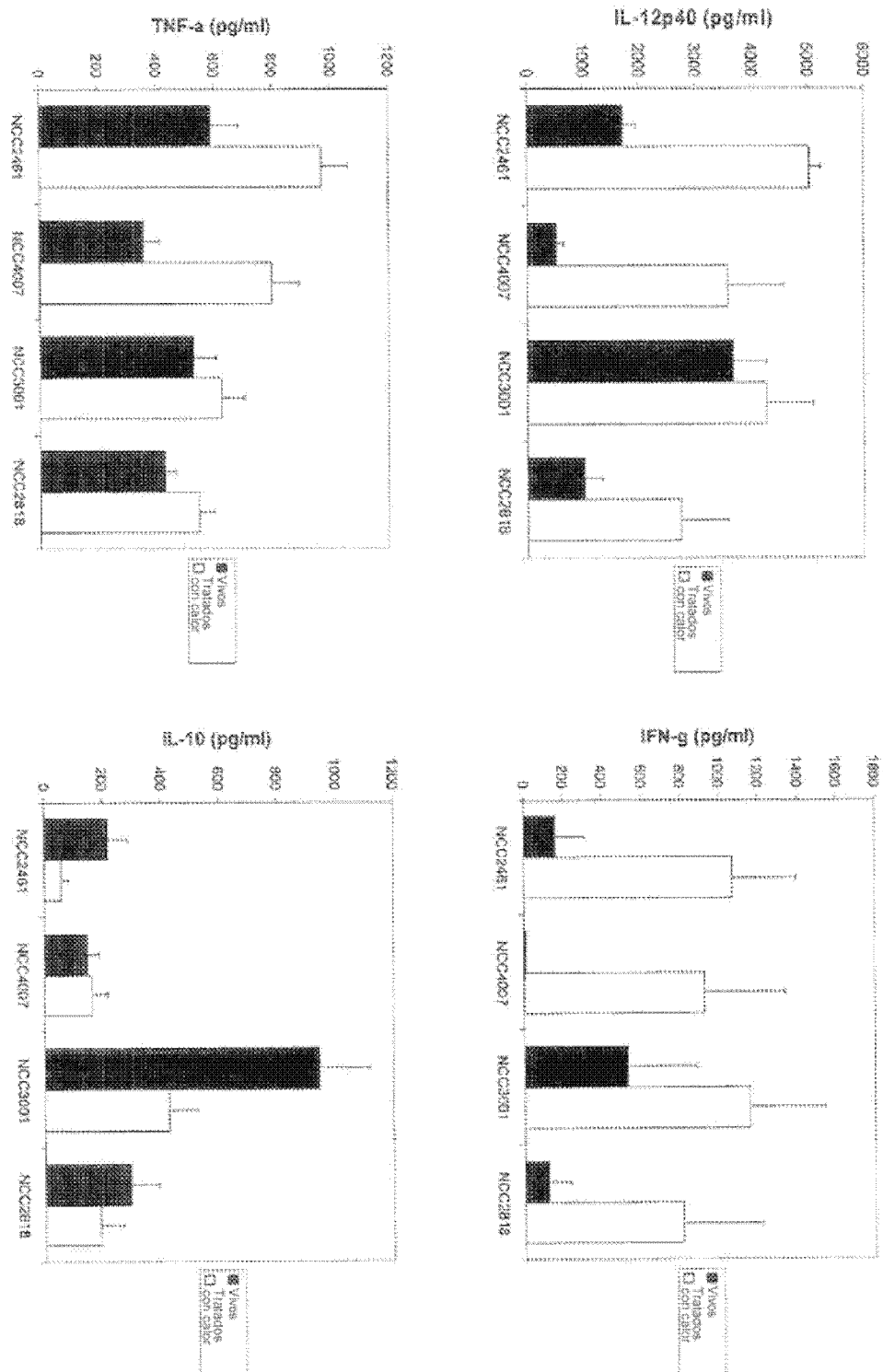


Figura 9:

