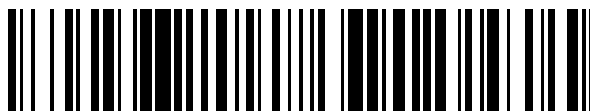


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 651**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/EP2010/056295**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10130662**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10718181 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2429539**

54 Título: **Lactobacilos johnsonii La1 NCC533 (CNCM I-1225), no replicantes, y trastornos inmunes**

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:
12.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 608 651 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

Lactobacilos johnsonii La1 NCC533 (CNCM I-1225), no replicantes, y trastornos inmunes.

5 Sector de la invención

La presente invención, se refiere, de una forma general, al sector de la prevención y / o el tratamiento de trastornos o desórdenes inflamatorios e infecciosos, de una forma particular, mediante la estimulación de las defensas antimicrobianas endógenas. Una forma de presentación de la presente invención, es la consistente en el uso de *L. johnsonii* La1 NCC533 (número de depósito CNCM 1-1225), para su uso en el tratamiento y la prevención de desórdenes o trastornos relacionados con el sistema inmune, incluyendo a las infecciones.

Nuestro entorno medioambiental, se encuentra contaminado por parte de una amplia variedad de microorganismos potencialmente patógenos. Los queratinocitos de la piel, las células epiteliales que recubren el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio, el tracto genitourinario, proporcionan, todas ellas, una barrera física, la cual protege contra la intrusión microbiana, en el interior del cuerpo.

De una forma adicional, estos epitelios, contribuyen a las defensas del huésped, produciendo y secretando agentes antimicrobianos, para limitar el exceso de bacterias y de otros microorganismos. Estas moléculas antimicrobianas, constituyen la línea de defensa básica, de la inmunidad innata.

Las defensinas, representan una de las clases más importantes de péptidos antimicrobianos, en los seres humanos. Las defensinas, se producen mediante las células epiteliales del pulmón, de la cavidad oral, de tracto genitourinario, del tracto respiratorio, y del tracto gastrointestinal. Entre éstas, se encuentra la familia de las β -defensinas, incluyendo a la defensina 1 (hBD1), y a la defensina 2 (hBD2).

La hBD1, se expresa en varias superficies mucosas, tales como las consistentes en la mucosa oral, en la glándula salival, en el estómago, en el intestino delgado, en el colon, en el hígado, y en el páncreas. La hBD2, se encuentra presentes, así mismo, también, en las múltiples superficies mucosas, incluyendo a aquéllas de tracto gastrointestinal. De una forma adicional, estas dos defensinas, se encuentran presentes así mismo, también, en la saliva, y en el fluido de la superficie de las vías respiratorias, (véase, a dicho efecto, el trabajo de (Cunliffe, R. N. y Mahida, Y. R. 2004, en J Leukoc.Biol. 75: 49 - 58).

La hBD1 se expresa de una forma constitutiva, y nunca se ha demostrado el hecho de que ésta pueda regularse, aumentándola, de una forma consistente, mediante bacterias o mediante una inflamación (véase, a dicho efecto, el trabajo de Ou, G., et al., 2009, en Scand. J Immunol 69: 150 - 161).

Es bien conocido, en el arte especializado de la técnica, el hecho de que, los probióticos, son capaces de reforzar las varias líneas de defensa del intestino: la exclusión inmune, la eliminación inmune, y la regulación inmune. Se conoce así mismo, también, el hecho de que, los probióticos, estimulan la resistencia no específica del huésped, a los patógenos microbianos, y que así, de ese modo, ayudan a su erradicación.

Sin embargo, no obstante, a pesar de lo anteriormente expuesto, la expresión de la hBD1, según se ha reportado en el arte especializado de la técnica, no resulta afectada mediante la bacterias probióticas (véase, a dicho efecto, el trabajo de O'Neil, D. A. et al., en J Immunol 163: 6718 - 6724) y que se regula, aumentándola, sólo muy levemente, por parte de las cepas comensales (*Escherichia coli*) y patógenas (*Salmonella typhimurium*), (véase, a dicho efecto, el trabajo de Ou, G., et al., 2009, Scand. J Immunol 69: 150 - 161).

La aplicación de los probióticos, consiste, de una forma usual, en la reducción del riesgo de las enfermedades asociadas con la disfunción de la barrera intestinal (véase, a dicho efecto, el trabajo de E. Isolauri, et al, 2002, en Gut – El intestino -, 2002; 50: iii 54 – iii 59). Se cree que, los probióticos, son efectivos, mediante su supervivencia en el intestino, su estabilidad a los ácidos y a la bilis, y su colonización temporal de las superficies de las mucosas, en el tracto intestinal.

Así, por lo tanto, la amplia mayoría de la literatura publicada, trata y aborda el tema de los probióticos vivos. Sin embargo, no obstante, diversos estudios, han investigado los beneficios para la salud los cuales ofrecen las bacterias no replicantes, y la mayoría de ellos, indican el hecho de que, la inactivación de los probióticos, tal como, por ejemplo, mediante un tratamiento por calor, conduce a una pérdida de sus pretendidos beneficios para la salud, (véase, a dicho efecto, el trabajo de Rachmilewitz, D., et al., 2004, en Gastroenterology, – Gastroenterología -, 126: 520 -528; el trabajo de Castagliuolo, et al., 2005, en FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43: 197 - 204; el trabajo de Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, en Br. J. Nutr. 86: 285 - 289; y el trabajo de Kaila, M., et al., 1995, en Arch. Dis. Child 72: 51 - 53.).

El hecho de trabajar con bacterias viables, en los productos alimenticios, tiene hoy en día diversas desventajas. Las bacterias viables, no son usualmente muy resistentes al esfuerzo o estrés, y así, de este modo, por consiguiente, éstas son difíciles de manejar a una escala industrial, al mismo tiempo, que, de una forma simultánea, mantener su viabilidad. De una forma adicional, para algunas categorías de productos, puede no ser óptimo, el hecho de añadir microorganismos viables, en la formulación, debido al hecho de problemas de seguridad. Así, de este modo, existe una necesidad, en cuanto al hecho de poder disponer de microorganismos bioactivos no viables.

De una forma ventajosa, la provisión de microorganismos probióticos no replicantes, permitiría su reconstitución en el huésped, tal como, por ejemplo, de las composiciones nutritivas en polvo, al mismo tiempo que mantendrían sus beneficios para la salud, para el paciente consumidor. En base a lo anteriormente expuesto, podría ser deseable el hecho de trabajar con bacterias no replicantes, en lugar de trabajar con sus homólogos o equivalentes vivos, pero, sin embargo, no obstante, los estudios los cuales se encuentran disponibles, en este respecto, no son esperanzadores.

El uso de los probióticos vivos, como una estrategia para el tratamiento o la prevención de las enfermedades inflamatorias del intestino, se ha reportado en la literatura correspondiente al arte especializado de la técnica, y éste se ha revisado, recientemente, por parte de Dotan et al. (véase, a dicho efecto, el trabajo de Dotan, I. y D. Rachmilewitz. 2005; en Curr. Opin. Gastroenterol. 21: 426 - 430). Así, por ejemplo, ha resultado ser efectivo, un cóctel altamente concentrado de ocho bacterias probióticas vivas (VSL#3), en la prevención (Gionchetti, P., et al., 2003, Gastroenterology, - Gastroenterología -, 124: 1202 - 1209) y en el tratamiento de la pouchitis o reservoritis refractaria recurrente, en los seres humanos (véase, a dicho efecto, el trabajo de Gionchetti, P., et al., 2000, Gastroenterology, - Gastroenterología -, 119: 305 - 309; y el trabajo de Mimura, T., et al., 2004, Gut - El intestino -, 53: 108 - 114). De una forma interesante, mediante la utilización de un modelo murino de la colitis inducida por DSS, Rachmilewitz et al. (véase, a dicho efecto, el trabajo de Rachmilewitz, D., et al., 2004, en Gastroenterology, - Gastroenterología -, 126: 520 - 528), han reportado el hecho de que, los tratamientos con VSL#3, viable e γ -irradiado, pero no con VSL#3, aniquilados (matados) mediante calor, protegían contra la colitis. De una forma similar, el *L. crispatus*, fracasaba en la protección contra la colitis inducida por DSS, mientras que, su homólogo viable, reducía, claramente, la pérdida de peso corporal y la actividad MPO, en el intestino (véase, a dicho efecto, el trabajo de Castagliuolo, et al., 2005, en FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43: 197 - 204). Estos estudios, sugieren el hecho de que, los probióticos, son más efectivos, vivos, en el contexto de la inflamación del intestino, que sus homólogos no replicantes.

El *L. reuteri* inactivado (aniquilado [matado] por calor e γ -irradiado), se encontró como no siendo apto para disminuir la producción de IL-8 inducido por TNF α , mediante células T84, mientras que, su homólogo vivo, exhibía un significativo efecto beneficioso (véase, a dicho efecto, el trabajo de Ma, D., et al., 2004, en Infect. Immun. 72: 5308 - 5314).

Así, de este modo, existe una necesidad, en el arte especializado de la técnica, en cuanto al hecho de poder disponer de composiciones naturales, las cuales sean fáciles de manejar, bajo unas condiciones industriales, y las cuales sean susceptibles de poderse administrar de una forma segura y sencilla, y que permitan la prevención y / o el tratamiento de los desórdenes o trastornos inflamatorios e infecciosos, de una forma particular, fortaleciendo o estimulando las defensas antimicrobianas endógenas.

De una forma ideal, la composición natural, debería prepararse a partir de cultivos probióticos, de una forma particular, a partir de microorganismos probióticos, los cuales sean bien aceptados, en la actualidad, y que se reconozcan, por parte de los consumidores, como proporcionando unos beneficios para la salud. De una forma ventajosa, la composición en cuestión, debería contener bacterias no replicantes, y debería ser más efectiva que su homólogo vivo.

Los presentes inventores, han abordado y solucionado esta necesidad.

Así, de este modo, era un objetivo de la presente invención, el mejorar el estado actual de la técnica especializada y proporcionar una composición natural, la cual previniera y / o tratara los desórdenes o trastornos inflamatorios e infecciosos, de una forma particular, mediante una composición natural, y de una forma particular, mediante la estimulación o fortalecimiento de las defensas antimicrobianas endógenas, y que cumpliera con los requerimientos los cuales se han listado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente.

Los inventores, se sorprendieron al ver que podrían conseguir el objetivo de la presente invención, mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes, la cuales se anexan a este documento de solicitud de patente. Las reivindicaciones independientes, definen, de una forma adicional, las formas preferidas de presentación de la presente invención.

La materia objeto de la presente invención, fortalece y consolida las defensas antimicrobianas endógenas de los mamíferos, con un producto el cual contiene microorganismos tratados por calor, en concordancia con la reivindicación 1.

Los inventores, describen el hecho de que, la cepa de lactobacilo *L. johnsonii* (La1, NCC 533, nº de depósito CNCM I-1225), de una forma particular, la cepa *L. johnsonii*, (La1, NCC 533, nº de depósito CNCM I-1225), no replicante, tal como, por ejemplo, el *L. johnsonii* (La1, NCC 533, número de depósito CNCM I-1225), tratado mediante calor, tiene unos efectos superiores en la inducción de la expresión de los péptidos antimicrobianos, que aquéllos los cuales se han identificado y descrito previamente, en la literatura correspondiente al arte especializado de la técnica.

Así, por ejemplo, se encontró el hecho de que:

- El *L. johnsonii* (La1, NCC 533, nº de depósito CNCM 1-1225), induce fuertemente la expresión constitutiva de la hBD1, y que,

- El *L. johnsonii* (La1, NCC 533, nº de depósito CNCM 1-1225), regula la hBD1, aumentándola, de una forma más fuerte que la que lo hace su homólogo vivo.

La hBD1 (defensina 1), exhibe una actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de las bacterias, incluyendo a la bacterias *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, *H. pylori* (véase, a dicho efecto, el trabajo de Nuding, S., et al., 2009, en *Microbes. Infect.* 11: 384 - 393), y también, contra las levaduras u hongos, tales como los consistentes en el *Candida albicans* (véase, a dicho efecto, el trabajo de O'Neil, D.A. 2003, en *Mol. Immunol* 40: 445 - 450) y contra los virus (virus de la inmunodeficiencia humana), (véase, a dicho efecto, el trabajo de Kota, S. Et al., 2008, en *J. Biol. Chem* 283: 22417 - 22429) y virus de la inmunodeficiencia...) (véase, a dicho efecto, Kota, S. Et al., 2008, *J. Biol. Chem* 283: 22417- 22429). Así, de este modo, estos péptidos antimicrobianos, pueden reforzar la barrera de la mucosa, y así, por consiguiente, limitar la adherencia y la invasión bacterianas.

Las cada día más evidencias existentes, indican el hecho de que, los niveles de las defensinas, se reducen, en ciertas condiciones patofisiológicas, y que existe un factor de riesgo, en la patogénesis y en las complicaciones de las enfermedades infecciosas e inflamatorias, tales como las consistentes en las relacionadas abajo a continuación (véase, a dicho efecto, el trabajo de Doss, M.et al., 2010, en *J Leukoc. Biol.* 87: 79 - 92); y el trabajo de Rivas - Santiago, B. et al., 2009, en *Infect. Immun.* 77: 4690 - 4695):

- En el tracto respiratorio:

La fibrosis cística, las enfermedades reactivas de las vías aéreas (respiratorias), las infecciones del pulmón y el fumar tabaco, el asma, la neumonía, la rinitis, la otitis, la sinusitis, la tuberculosis

- En el tracto gastrointestinal:

La enfermedad de Crohn (colon e íleon), la colitis ulcerante, la gastritis, y la úlcera gástrica inducida mediante la infección por *Helicobacter pylori*, la diarrea infecciosa, la enterocolitis necrotizante, la diarrea asociada con los antibióticos, la enfermedad celíaca, la inmadurez intestinal

- En el tracto genitourinario:

La vaginosis bacteriana, el HIV, el virus del herpes simple, la infección urinaria

- En la piel:

La dermatitis atópica, la úlcera crónica, el carcinoma, el eczema atópico, las lesiones por quemaduras

- En la cavidad oral:

Los pacientes con HIV, la tonsilitis, la gingivitis, la caries dental

- La queratitis en los ojos

Los resultados los cuales se presentan aquí, en este documento de solicitud de patente, indican el hecho de que, el *L. johnsonii* La1 (NCC 533, nº de depósito CNCM 1-1225), tiene una capacidad más fuerte para estimular la defensa antimicrobiana endógena que la correspondiente a la bacterias probióticas anteriormente identificadas, y que así, de este modo, puede ser más eficaz en el tratamiento y la prevención del tratamiento del SIBO (sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a small intestinal bacterial overgrowth] -), de los trastornos o desórdenes inflamatorios, y de los trastornos o desórdenes infecciosos.

De una forma adicional, los datos los cuales se encuentran en poder de los inventores, indican, - de una forma contraria a lo que se podría esperar, a raíz de lo expuesto en la literatura correspondiente al arte especializado de la técnica -, el hecho consistente en que, el tratamiento por calor, no reduce el fuerte efecto antimicrobiano del *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM I-1225), sino que, muy al contrario, éste lo incrementa.

Una forma de presentación de la presente invención, es la consistente en una composición la cual comprende el *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM I-1225), para su uso en el tratamiento o en la prevención de los desórdenes o trastornos vinculados al sistema inmune, incluyendo a las infecciones.

En concordancia con la presente invención, los desórdenes o trastornos vinculados al sistema inmune, pueden tratarse o prevenirse, procediendo a incrementar la expresión endógena de la hBD1.

La presente revelación de la invención, se refiere así mismo, también, a una composición, la cual comprende la cepa del lactobacilo *L. johnsonii* La1 (NCC533, número de depósito CNCM 1-1225), para su uso en el tratamiento o en la prevención de los desórdenes o trastornos vinculados a la expresión reducida de la hBD1, tales como, por ejemplo, los consistentes en las infecciones microbianas.

La presente revelación de la invención, se refiere así mismo, también, al uso del *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), en la preparación de una composición para el tratamiento o la prevención de los desórdenes o trastornos vinculados al sistema inmune.

La cepa de lactobacilo *L. johnsonii* La1, (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), no replicante, puede utilizarse por lo menos parcialmente. La cepa *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), no replicante, de una forma especial, tratada por calor tiene la ventaja de ser incluso más efectiva, que su homólogo vivo.

El uso de microorganismos no replicantes, tales como los consistentes en el *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), tratado por calor, en lugar de sus homólogos, tiene, de una forma adicional, las ventajas consistentes en:

- reducir el riesgo potencial de una sepsis asociada con los probióticos vivos, en las poblaciones sensibles objetivizadas como diana,
- representar una alternativa segura a los pacientes inmunocomprometidos, y
- la reducción de las trabas o dificultades del procesado, pueden integrarse en productos líquidos autoestables con un prolongado tiempo de vida de conservación.

Así, de este modo, en una forma de presentación de la presente invención, por los menos un porcentaje del 90 %, tal como, por ejemplo, por lo menos un porcentaje del 95 %, de una forma preferible, por lo menos un porcentaje del 98 %, de una forma mayormente preferible, por lo menos un porcentaje del 99 %, de una forma ideal, por lo menos un porcentaje del 99,9 %, ó la totalidad de los *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), son no replicantes.

La presente revelación de la invención, se refiere así mismo, también, a una composición, la cual comprende el *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), en donde, por los menos un porcentaje del 95 %, de una forma preferible, por lo menos un porcentaje del 98 %, de una forma mayormente preferible, por lo menos un porcentaje del 99 %, de una forma ideal, por lo menos un porcentaje del 99,9 %, ó un porcentaje del 100 % de los *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), son no replicantes.

Así, de este modo, la presente revelación de la invención, se refiere así mismo, también, a lactobacilos de la cepa *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM I-1225), bioactiva, no replicante, por ejemplo, tratada por calor.

La cepa de lactobacilo *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), "no replicante", incluye al *L. johnsonii* La1, el cual se ha tratado por calor. Esto incluye a los *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), los cuales se han inactivado, muertos, no viables y / o presentes como fragmentos, tales como los consistentes en el DNA, en metabolitos, en compuestos citoplásmicos, y / o materiales de paredes celulares.

"No replicantes", significa el hecho de que pueden detectarse células no viables y / o unidades de formación de colonias, mediante los procedimientos clásicos de detección mediante recubrimientos en placas. Tales tipos de procedimientos clásicos de análisis mediante recubrimientos en placas, se encuentran resumidos en el siguiente libro de microbiología: James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden. 2005. Modern food microbiology, - Microbiología moderna de los alimentos, 7ª edición, Springer Science, New York, N.Y. 790 p. De una forma típica, la ausencia de células viables, puede verse del siguiente modo: ninguna colonia visible sobre placas de agar, o ninguna turbidez incrementante en el medio de crecimiento líquido, después de la incubación mediante diferentes

concentraciones de preparaciones bacterianas ("muestras no replicantes"), e incubación bajo unas condiciones apropiadas (una atmósfera aeróbica y / o anaeróbica, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 24 horas).

- 5 El *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), puede convertirse en un lactobacilo no replicante, mediante una inactivación por calor. La inactivación mediante calor, puede acontecer a una temperatura de aproximadamente 70 °C.

- 10 Puede utilizarse cualquier tratamiento por calor, para inactivar los probióticos, siempre y cuando éste se lleve a cabo durante un transcurso de tiempo lo suficientemente prolongado, para lograr la inactivación. Así, por ejemplo, tal tipo de tratamiento por calor, puede llevarse a cabo durante un transcurso de tiempo de por los menos 10 segundos.

De una forma típica, una alta temperatura, requerirá un reducido tiempo de calentamiento, mientras que, unas temperaturas más bajas, requerirán un calentamiento más prolongado en el tiempo.

- 15 Así, por ejemplo, el *L. johnsonii* La1 (NCC533, número de depósito CNCM 1-1225), puede convertirse en un lactobacilo no replicante, sometándolo a un calentamiento a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los 110 °C hasta los 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 1 - 30 segundos, tal como, por ejemplo, durante un transcurso de tiempo de 10 - 20 segundos.

- 20 El marco de tiempo proporcionado, se refiere al transcurso de tiempo durante el cual, los lactobacilos de la cepa *L. johnsonii* La1, se someten a la temperatura dada. Se tomará debida nota, en cuanto al hecho de que, en dependencia de la cantidad en la que los *L. johnsonii* La1 se encuentran provistos en la composición, y en dependencia del diseño arquitectónico del aparato de calentamiento utilizado, puede variar el tiempo de aplicación del calor. El tratamiento a una temperatura dada, puede llevarse a cabo a una presión atmosférica normal, pero, sin embargo, no obstante, ésta puede llevarse a cabo, así mismo, también, a una alta presión. La presión, de una forma típica, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 1 bar hasta 5 bar. Una presión ideal a ser aplicada, dependerá de la naturaleza de la composición en la que se encuentran provistos los microorganismos, y de la temperatura utilizada.

- 30 Si las composiciones en las que se encuentran provistos los La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), están tratados mediante calor, de cualquier forma, tal como, por ejemplo, antes de que éstas se envasen y se distribuyan, podría entonces ser preferible el usar esta etapa del tratamiento por calor, para inactivar los La1 NCC533.

- 35 De una forma típica, las composiciones las cuales contienen los La1 (NCC 533, nº de depósito CNCM 1-1225), pueden tratarse mediante un tratamiento de una alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo (HTST – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a high temperature short time] -), o mediante una pasteurización flash (de evaporación instantánea), o mediante un tratamiento a una temperatura ultra alta (UHT – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a ultra high temperature] -).

- 40 Un tratamiento UHT, es un procesado a una temperatura ultra-alta, o un tratamiento de ultra-calentamiento (ambos tratamientos, abreviados mediante las siglas UHT), los cuales involucran el hecho de una esterilización por lo menos parcial, de una composición, procediendo a su calentamiento, durante un corto transcurso de tiempo, de alrededor de 1 – 10 segundos, a una temperatura que exceda de los 135 °C (275 °F), la cual es la temperatura que se requiere, para matar o aniquilar las esporas bacterianas en la leche. Así, por ejemplo, el hecho de procesar la leche de este modo, mediante la utilización de unas temperaturas las cuales excedan de los 135 °C, permite una reducción de la carga bacteriana, en el tiempo de retención necesario (de hasta 2 – 5 segundos), permitiendo un operación de flujo continuo.

- 50 Existen dos tipos principales de sistemas de UHT: el sistema directo y el sistema indirecto. En el sistema directo, los productos, se tratan mediante inyección de vapor o mediante infusión de vapor, mientras que, en el sistema indirecto, los productos, se tratan mediante calor, mediante la utilización un intercambiador de calor de placas, mediante la utilización de un intercambiador de calor tubular, o mediante un intercambiador de calor de superficie rasquetada. Las combinaciones de sistemas de UHT, pueden aplicarse en cualquier etapa, o en múltiples etapas, en el proceso de preparación del producto.

- 55 Un tratamiento de HTST (alta temperatura / reducido transcurso de tiempo – [de sus iniciales, en idioma inglés, correspondientes a High Temperature / Short Time], se define de la forma que se facilita a continuación: Procedimiento de pasteurización, el cual está concebido para la realización y consecución de una reducción 5 – log, aniquilando (eliminando) un porcentaje del 99,9999 % del número de microorganismos viables en la leche. Esto, se considera como siendo apropiado para la destrucción de la casi la totalidad de los fermentos o levaduras, de los hongos, y de las bacterias comunes de descomposición, y así mismo, también, para asegurar una destrucción apropiada de los organismos patogénicos resistentes al calor. En el proceso de HTST, se procede a calentar la leche, a una temperatura de 71,7 °C (161 °F), durante un transcurso de tiempo de 15 – 20 segundos.

La pasteurización Flash (de evaporación instantánea), es un procedimiento de pasteurización por calor de las bebidas perecederas, tales como, por ejemplo, las consistentes en los jugos o zumos de frutas o de vegetales, en la cerveza, y en los productos lácteos. Este procedimiento de pasteurización por evaporación instantánea (evaporación Flash), se lleva a cabo previamente a proceder al llenado de las bebidas perecederas en cuestión, al interior de los recipientes contenedores, con objeto de aniquilar o eliminar los microorganismos de la descomposición, para convertir a los productos en seguros, y para alargar su tiempo de vida de conservación. El líquido, se mueve en un flujo continuo controlado, al mismo tiempo que, de una forma simultánea, éste se somete a unas temperaturas correspondientes a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los 71,5 °C (160 °F), hasta los 74 °C (165 °F), durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 15 a 30 segundos.

Para los propósitos de la presente invención, el término consistente en la expresión "tratamiento mediante un reducido transcurso de tiempo y una alta temperatura", incluirá a ambos, los tratamientos de UHT, y la pasteurización Flash (de evaporación instantánea), por ejemplo.

Las composiciones de la presente invención, pueden comprender el lactobacilo La1, en una cantidad suficiente como para tratar, por los menos parcialmente, las infecciones y los desórdenes o trastornos vinculados al sistema inmune y / o sus complicaciones. Una cantidad apropiada, para llevar a cabo y cumplir con este requisito, se define como "una dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades terapéuticamente efectivas para este propósito, dependerán de un gran número de factores, factores éstos, los cuales son conocidos por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tales como los consistentes en la gravedad de la enfermedad y del peso del consumidor, así como también del estado general de salud del consumidor en cuestión, y del efecto de la matriz alimenticia.

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones utilizadas en concordancia con la presente invención, se administran, a un consumidor el cual sea susceptible de sufrir trastornos o desórdenes vinculados al sistema inmune, o de otro modo, a un consumidor el cual se encuentre en riesgo de sufrir dichos trastornos o desórdenes vinculados al sistema inmune, en una cantidad la cual sea suficiente como para reducir, por lo menos parcialmente, el riesgo de desarrollar dichos desórdenes o trastornos. Aquí, otra vez, la cantidades precisas de las composiciones en concordancia con la presente invención, a ser utilizadas, dependerán de una gran número de factores específicos del paciente en cuestión, tales como los consistentes en el estado de salud del paciente, del peso del paciente, y del efecto de la matriz alimenticia.

Aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, estarán capacitadas para ajustar la dosis terapéuticamente efectiva y / o la dosis terapéuticamente efectiva, de una forma apropiada.

De una forma general, la composición de la presente revelación de la invención, contiene el lactobacilo La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), en una dosis terapéuticamente efectiva y / o en una dosis profilácticamente efectiva.

De una forma típica, la dosis terapéuticamente efectiva y / o la dosis profilácticamente efectiva, es la correspondiente a un valor comprendida dentro de unos márgenes de aprox. 0,005 mg - 1000 mg de La1, por dosis diaria.

En términos de cantidades numéricas, el La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), puede encontrarse presente en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre los 10^4 equivalentes de ufc / g y los 10^{12} equivalentes de ufc / g, de la composición en estado seco. Obviamente, los microorganismos no replicantes, no forman colonias y, por consiguiente, este término, deberá entenderse como la cantidad de microorganismos no replicantes, la cual se obtiene, a partir de 10^4 y de 10^{12} ufc / g de bacterias replicantes. Esto, incluye a los microorganismos los cuales se encuentran inactivados, que son no viables o que se encuentran muertos o aniquilados, o que se encuentran presentes como fragmentos, tales como los consistentes en DNA, o paredes celulares, o compuestos citoplásmicos. En otras palabras, la cantidad de microorganismos la cual contiene la composición, se expresa en términos de capacidad de formación de colonias (ufc), de la cantidad de microorganismos, tal como si, la totalidad de los microorganismos, se encontraran vivos, de una forma independiente, en cuanto al hecho de si éstos son, de hecho, no replicantes, tal como inactivados o muertos, fragmentados, o bien una mezcla de una cualquiera o de la totalidad de estos estados.

Así, por ejemplo, la composición en concordancia con la presente revelación de la invención, puede contener una cantidad de *L.johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde los aprox. 10^4 ufc hasta las 10^{12} ufc, por dosis diaria,

La composición de la presente revelación de la invención, puede contener una cantidad de *L.johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), correspondiente a un valor de aprox. 0,005 mg - 1000 mg de *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225) por dosis diaria.

La composición de la presente invención, puede consistir en cualquier clase de composición. La composición en cuestión, puede administrarse oralmente, enteralmente, parenteralmente (bien ya sea por subcutánea o bien ya sea por vía intramuscular), tópicamente, u ocularmente, o mediante inhalación, intrarrectalmente e intravaginalmente, por ejemplo.

Así, de este modo, la composición de la presente revelación de la invención, puede seleccionarse de entre el grupo consistente en las composiciones alimenticias, en los productos alimenticios, incluyendo a los productos alimenticios para animales de compañía o domésticos, en las bebidas, en la fórmulas para una nutrición completa, en suplementos nutritivos, en los nutracéuticos, en los aditivos alimenticios, en las composiciones farmacéuticas, en las composiciones cosméticas, en los medicamentos, en las composiciones tópicas.

A las composiciones en cuestión, se les puede añadir prebióticos. Los prebióticos, pueden soportar el crecimiento de los probióticos, antes de que éstos se conviertan en no replicantes. Los prebióticos, pueden también actuar, así mismo, también, de una forma sinérgica, con las bacterias probióticas viables, las cuales se encuentren presentes en la composición y / o las cuales puedan añadirse.

El desorden o trastorno vinculado al sistema inmune, puede seleccionarse de entre el grupo consistente en las infecciones, de una forma particular, las infecciones bacterianas, las infecciones víricas, las infecciones fúngicas y / o las infecciones parasitarias; las inflamaciones; las deficiencias de fagocitos; los defectos de la barrera epitelial, la inmadurez del sistema inmune; el SIBO (SIBO (sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado), y combinaciones de entre éstos.

En una forma de presentación de la presente invención, la composición la cual comprende *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM I-1225), es para el uso en el tratamiento o la prevención de las infecciones microbianas tales como las consistentes en las infecciones víricas, en las infecciones fúngicas y / o en las infecciones parasitarias.

El trastorno o desorden vinculado al sistema inmune, se selecciona de entre el grupo consistente en la fibrosis cística, las enfermedades reactivas de las vías aéreas (respiratorias), las infecciones del pulmón procedentes del fumar tabaco, el asma, la neumonía, la rinitis, la otitis, la sinusitis, la tuberculosis, la enfermedad de Crohn (colon e íleon), la colitis ulcerante, la enfermedad celíaca, la inmadurez intestinal, la gastritis, y la úlcera gástrica inducida mediante la infección por *Helicobacter pylori*, la diarrea infecciosa, la enterocolitis necrotizante, la diarrea asociada con los antibióticos, la vaginosis bacteriana, el HIV, el virus del herpes simple, la infección urinaria, la dermatitis atópica, la úlcera crónica, el carcinoma, el eczema atópico, las lesiones por quemaduras, la tonsilitis, la gingivitis, la caries dental, la queratitis en los ojos, y las combinaciones de entre éstos.

La composición de la presente invención, puede utilizarse para estimular o aumentar las defensas antimicrobianas endógenas.

Esto puede lograrse, por ejemplo, procediendo a estimular o potenciar la expresión endógena de la hBD1.

Los presentes inventores, han encontrado el hecho consistente en que, la cepa de loctabacilos consistente en el *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), induce fuertemente la expresión constitutiva de la hBD1, y que, el *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), no replicante, tratado mediante calor, regula la expresión de la hBD1, aumentándola, incluso de una forma más fuerte que lo que lo hace su homólogo vivo. Así, por consiguiente, el tema abordado por la presente invención, abarca así mismo, también, a un procedimiento para incrementar la efectividad del *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), en el tratamiento o en la prevención de los desórdenes o trastornos vinculados al sistema inmune, procedimiento éste, el cual comprende la etapa de convertir al *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), en no replicante, mediante un tratamiento por calor, de la forma la cual se define en la reivindicación 1.

El desorden o trastorno vinculado al sistema inmune, puede ser, por ejemplo, uno de los desórdenes o trastornos los cuales se han enumerado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente.

Aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, entenderán el hecho de que, éstos, pueden proceder a combinar libremente, todos los rasgos distintivos y característica de la presente invención, los cuales se han descrito aquí, en este documento de solicitud de patente, sin por ello apartarse de ámbito de la presente invención, de la forma la cual se ha descrito y dado a conocer ésta. De una forma particular, los rasgos distintivos o características descritos para las composiciones de la presente revelación de la invención, pueden aplicarse para los usos y / o para el procedimiento de la presente invención, y viceversa.

Otras ventajas y rasgos distintivos o características adicionales de la presente invención, resultarán evidentes, a raíz de los ejemplos y de las figuras los cuales se facilitan abajo, a continuación.

La figura 1, muestra el hecho consistente en que, el La1 (NCC533, n° de depósito CNCM I-1225), a una temperatura y un transcurso de tiempo de, respectivamente, 120°C – 15 segundos, induce fuertemente el hBD1 mRNA, en las células epiteliales intestinales, in vitro, en comparación con otras cepas tratadas mediante calor. Se procedió a incubar células T84, durante un transcurso de tiempo de 4 horas, con las cepas tratadas por calor. Se procedió, a continuación, a analizar la expresión genética de la hBD1, mediante PCR a tiempo real. Las barras, representan la media $\pm$ sem (error estándar de la media), normalizada a la expresión basal de células no estimuladas.

La figura 2, muestra el hecho consistente en que, un tratamiento a alta temperatura y durante un corto transcurso de tiempo del La1 (NCC533, n° de depósito CNCM I-1225), tiende a ser el mejor, para inducir la expresión de hBD1 mRNA. Se procedió estimular células T84, durante un transcurso de tiempo de 4 horas, con los La1 (NCC533, n° de depósito CNCM I-1225), vivos, y tratados por calor, a una temperatura de 120°C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos, ó a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos. Se procedió, a continuación, a analizar la expresión genética de la hBD1, mediante PCR a tiempo real. Las barras, representan la media $\pm$ sem (error estándar de la media), normalizada a la expresión basal de células no estimuladas.

Ejemplos

Protocolo experimental

Se procedió a utilizar células T84, procedentes del paso 30 – 40, y éstas se cultivaron en medios esencial modificado de Dulbecco / F1 – 12 (Sigma D 6421) con un contenido correspondiente a un porcentaje del 5 % de suero bobino fetal (FCS) – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a foetal calf serum] –, (de procedencia de la firma Amimed BioConcept) y 2mM glutamina. Las células, se sembraron a una concentración de 2×10^6 células / pozo, en placas de cultivo de 6 pozo, y éstas se hicieron crecer como monocapas, a una temperatura de 37 °C, en unas condiciones atmosféricas correspondientes a un 5 % de CO₂ – un 95 % de aire. Las células se hicieron crecer, durante un transcurso de tiempo de 1 semana y después de la confluencia, éstas se incubaron con suero y medio exento de antibiótico, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 12 horas. Esta etapa, era necesaria, con objeto de eliminar la defensiva inducida mediante suero, y prevenir cualquier tipo de influencia procedente de los antibióticos, sobre los probióticos, y sobre la respuesta inmune de las células. Las células, se incubaron adicionalmente con probióticos, o bien, con cepas tratadas por calor, durante un transcurso de tiempo de 4 horas. Al final del tiempo de incubación, las células, se lavaron con PBS, y éstas se recolectaron con reactivo de aislamiento TriPure™, en concordancia con las instrucciones del proveedor. La expresión genética de los genes hBD1 y hBD2, en las células de esta forma tratada, se evaluaron mediante PCR cuantitativa.

Las cepas bacterianas las cuales se utilizaron para la realización de este experimento, fueron las consistentes en las *B. longum* (NCC 2705, n° de depósito CNCM I-2618), *B. lactis* (NCC 2818, n° de depósito CNCM I-3446), *L. johnsonii* (La1, NCC 533, n° de depósito CNCM I-1225), *L. paracasei* (ST11, NCC 2461, n° de depósito CNCM I-2116). Estas cepas, se sometieron a tests de ensayo, vivas, o bien tratadas por calor, a bien ya sea a una temperatura de 120 °C, a una temperatura durante un transcurso de tiempo de 15 segundos, o bien, a una temperatura de 85 °C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos.

Resultados:

La La1 (NCC533, n° de depósito CNCM I-1225), tratadas a una temperatura de 120°C, durante un transcurso de tiempo de 15 segundos, inducía fuertemente la expresión del mRNA de la hBD1, después de un transcurso de tiempo de incubación de 4 horas (véase, a dicho efecto, la figura 1), en contraste con las otras cepas tratadas por calor. Estos datos, son únicos, ya que, según se cree, de una forma usual, por parte de la comunidad científica, la expresión de la hBD1, la cual se expresa constitutivamente, no es susceptible de poderse modular, mediante microbios, mediante productos microbianos, o mediante inflamación.

Ambas, la La1 (NCC533, n° de depósito CNCM I-1225), viva, o tratada mediante calor, inducían fuertemente expresión del hBD1 mRNA, pero, la máxima inducción de la hBD1, se obtuvo mediante la L1 tratada por calor) (mediante un tratamiento de alta temperatura, durante un corto transcurso de tiempo) (véase, a dicho efecto, la figura 2).

REIVINDICACIONES

- 1.- Composición la cual comprende *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM I-1225), para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos vinculados al sistema inmune, en donde, un porcentaje de por lo menos un 90 %, tal como, por ejemplo, un porcentaje de por lo menos un 95 %, de la totalidad de *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), se convierten en no replicantes, tratándolas a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van desde los 110 °C hasta los 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 5 – 30 segundos, y en donde, el desorden, vinculado al sistema inmune, se selecciona de entre el grupo consistente las infecciones, de una forma particular, las infecciones bacterianas, las infecciones víricas, las infecciones fúngicas, y / o las infecciones parasitarias; las inflamaciones; las deficiencias de fagocitos; los defectos de la barrera epitelial; la inmadurez del sistema inmune; el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO)), y combinaciones de entre éstos, los trastornos vinculados a un reducido nivel de la defensina hBDA, seleccionados de entre grupo consistente en la fibrosis cística, las enfermedades reactivas de las vías aéreas (respiratorias), las infecciones del pulmón procedentes del fumar tabaco, el asma, la neumonía, la rinitis, la otitis, la sinusitis, la tuberculosis, la enfermedad de Crohn (colon e íleon), la colitis ulcerante, la enfermedad celíaca, la inmadurez intestinal, la gastritis, y la úlcera gástrica inducida mediante la infección por *Helicobacter pylori*, la diarrea infecciosa, la enterocolitis necrotizante, la diarrea asociada con los antibióticos, la vaginosis bacteriana, el HIV, el virus del herpes simple, la infección urinaria, la dermatitis atópica, la úlcera crónica, el carcinoma, el eczema atópico, las lesiones por quemaduras, la tonsilitis, la gingivitis, la caries dental, la queratitis en los ojos, y las combinaciones de entre éstos.
- 2.- Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la composición, contiene una cantidad de *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 10^4 hasta 10^{12} ufc por dosis diaria.
- 3.- Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la composición, contiene aprox. 0,005 mg – 1000 mg de *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), por dosis diaria.
- 4.- Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la composición, se selecciona de entre consistente en las composiciones alimenticias, en los productos alimenticios, incluyendo a los productos alimenticios para animales de compañía o domésticos, en las bebidas, en la fórmulas para una nutrición completa, en suplementos nutritivos, en los nutracéuticos, en los aditivos alimenticios, en las composiciones farmacéuticas, en las composiciones cosméticas, en las composiciones tópicas, y en los medicamentos
- 5.- Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, a ser utilizada para potenciar las defensas antimicrobianas endógenas, y / o la expresión endógena de la hBD1.
- 6.- Procedimiento para incrementar la efectividad del *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM I-1225), en el tratamiento o la prevención de infecciones y trastornos vinculados al sistema inmune, el cual comprende la etapa de convertir al *L. johnsonii* La1 (NCC533, nº de depósito CNCM 1-1225), en no replicante, mediante una etapa de tratamiento por calor, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van desde los 110 °C hasta los 140 °C, durante un transcurso de tiempo de 5 – 30 segundos

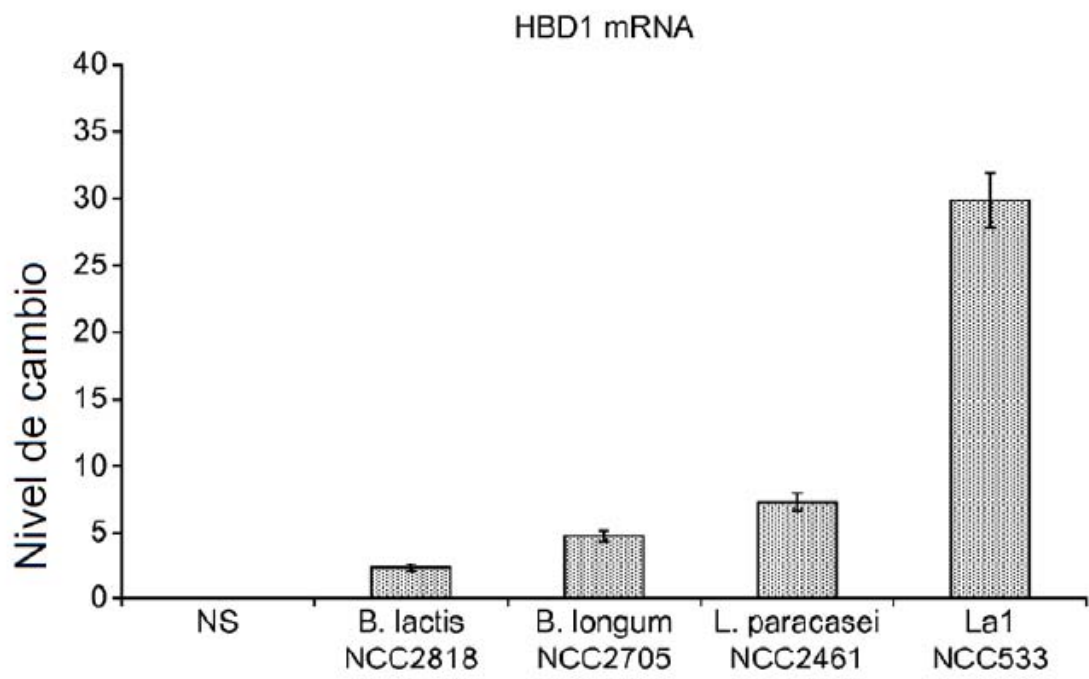


FIG. 1

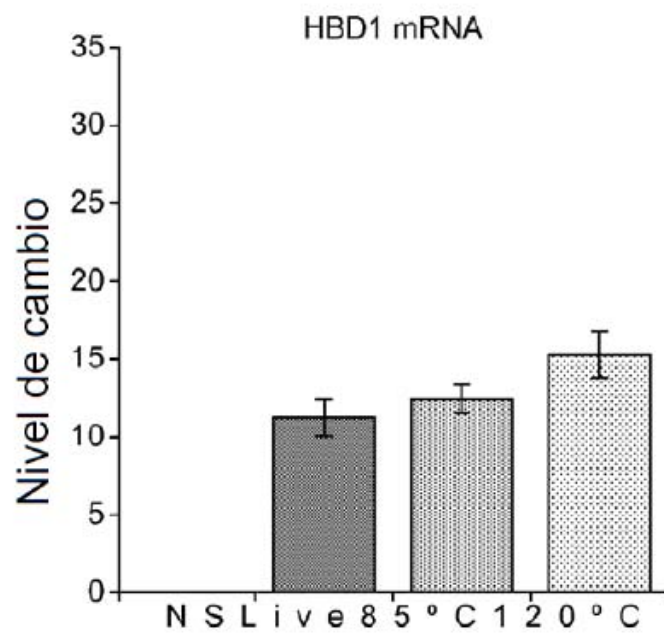


FIG. 2