

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 929**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2010 PCT/NL2010/050576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO2011031149**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2010 E 10757324 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2475764**

54 Título: **Material no viable derivado de probióticos, para la prevención y tratamiento de alergias**

30 Prioridad:

11.09.2009 EP 09170124

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

02.06.2017

73 Titular/es:

**MJN U.S. HOLDINGS LLC (100.0%)
2701 Patriot Boulevard, 4th Floor
Glenview, IL 60026, US**

72 Inventor/es:

**VAN TOL, ERIC, A.F.;
RUSSELL, WILLIAM, MICHAEL;
HERZ, UDO;
RENTZ, HARALD;
GARN, HOLGER;
BRAAKSMA, MACHTELT;
VAN DER WERF, MARIA, JOHANNA y
OVERKAMP, KARIN, M.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 614 929 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

Material no viable derivado de probióticos, para la prevención y tratamiento de alergias

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con un método para cosechar materiales biológicamente activos, no viables, de la cepa bacteriana probiótica *Lactobacillus rhamnosus* Goldin Gorbach (LGG). Particularmente, la invención se relaciona con un proceso para la preparación de un material probiótico antialérgico, obtenible mediante dicho método de cosecha, y con productos dietéticos o nutricionales que comprenden dicho material probiótico.

Fundamento de la invención

10 *Lactobacillus* GG (*Lactobacillus* G.G., cepa ATCC 53103) es una bacteria que ocurre naturalmente en el tracto digestivo humano. Es una bacteria muy estudiada, de beneficio para la salud generalmente reconocido. Es ampliamente reconocida como un probiótico, y consecuentemente incorporada en muchos productos nutricionales, tales como productos lácteos, suplementos nutricionales, fórmulas infantiles, y similares.

15 Los probióticos están actualmente definidos en la técnica como microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped. Sin embargo, la naturaleza viva de los probióticos trae consigo desafíos cuando se incorporan en los productos nutricionales. Estos desafíos pueden variar en orden de magnitud dependiendo de, entre otros, el tipo de cepa probiótica usada, el estado de salud del individuo que recibe el producto, o ambos. También, desde el punto de vista de un proceso tecnológico, se requiere superar considerables obstáculos cuando se incorporan microorganismos vivos en los productos. Particularmente, esto juega un papel si uno fuera a incorporar probióticos en productos larga vida, por ejemplo
20 productos en polvo tales como fórmulas infantiles. También, los desafíos aumentan con el incremento en la complejidad de las matrices de los productos nutricionales.

En particular, respecto a los productos dietéticos para en mujeres embarazadas, niños e infantes, el uso de bacterias probióticas está sujeto a evaluación adicional respecto a la inocuidad y eficacia. Las preguntas específicas respecto a inocuidad se refieren a los posibles efectos en el uso de nutrientes, la exclusión de
25 transferencia de resistencia a antibióticos y los efectos en el corto y largo plazo sobre la colonización intestinal, respuesta inmune e infecciones. Mientras esta no indica que los probióticos no podrían ser usados en tales productos, se añade a la complejidad práctica de usar bacterias vivas o de otro modo viables.

Por otro lado, especialmente en el caso de productos dietéticos para infantes y niños, existe una demanda importante para el suministro de los efectos benéficos de los probióticos. Además, es particularmente desafiante
30 asegurar la estabilidad y vitalidad de las bacterias viables en los productos nutricionales que se ponen a disposición a través de canales de venta al por menor u hospitales y expuestos a temperatura ambiente. A este respecto, el uso de productos bacterianos, a través de la aplicación de sobrenadantes de cultivos (procesados), suministrarían considerables ventajas.

35 Se sabe que la microflora intestinal en infantes está mucho menos desarrollada que la de un adulto. Mientras la microflora del humano adulto consiste en más de 10^{13} microorganismos y cerca de 500 especies, donde algunas son dañinas y algunas son benéficas, la microflora de un infante contiene sólo una fracción de aquellos microorganismos, tanto en número absoluto como también en diversidad de especies. Los infantes nacen con un intestino estéril, pero adquieren flora intestinal del canal natal, su ambiente inicial, y lo que ellos ingieren. Dado que la población de microflora intestinal es muy inestable en la vida neonatal temprana, frecuentemente es difícil para
40 el intestino del infante mantener el delicado balance entre bacterias perjudiciales y benéficas, reduciendo así la capacidad del sistema inmune para funcionar normalmente.

Es especialmente difícil para infantes alimentados con fórmulas, mantener este balance, debido a las diferencias entre las especies bacterianas en el intestino de un infante alimentado con fórmulas y amamantado. Las heces de
45 infantes amamantados contienen predominantemente *Bifidobacterium*, con *Streptococcus* y *Lactobacillus* como contribuyentes menos comunes. En contraste, la microflora de infantes alimentados con fórmulas, es más diversa, conteniendo *Bifidobacterium* y *Bacteroides* así como las especies más patógenas *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, y *Clostridia*. Las especies variadas de *Bifidobacterium* en las heces de infantes amamantados y alimentados con fórmulas, difieren también. Se ha propuesto una variedad de factores como la causa para la diferente flora fecal de infantes amamantados y alimentados con fórmulas, incluyendo el menor contenido y diferente
50 composición de proteínas en la leche humana, un menor contenido de fósforo en la leche humana, la gran variedad de oligosacáridos en leche humana, y numerosos mediadores humorales y celulares de la función inmunológica en la leche de pecho. Agostoni, et al., Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition, *J. Pediatr. Gastro. Nutr.* 38:365-374 (Abril 2004).

El establecimiento de una flora bacteriana intestinal normal tiene importantes implicaciones para la salud y enfermedades. La mayor función de la microbiota intestinal, desde el punto de vista del huésped, es prevenir la colonización del intestino con organismos patógenos e inhibir la proliferación de microorganismos potencialmente patógenos, aumentando la resistencia natural a enfermedades infecciosas del tracto intestinal. Los probióticos ejercen este efecto previniendo la unión de bacterias patógenas a los enterocitos, bien sea directamente produciendo compuestos antimicrobianos, o indirectamente alterando el pH del lumen intestinal a través de la síntesis de ácidos grasos volátiles de cadena corta.

Adicionalmente, la flora normal podría estimular la inmunidad gastrointestinal, mejorar la producción de IgA de mucosas, estimular la producción local de citoquinas antiinflamatorias y reducir la generación de citoquinas proinflamatorias, características de la inflamación alérgica. Una revisión de los estudios más relevantes relacionados con el uso de probióticos en alergias alimentarias, dermatitis atópica, y prevención primaria de atopía ha mostrado que la terapia con probióticos alivia la inflamación alérgica, como se demuestra por el control de síntomas clínicos y la reducción de marcadores inflamatorios locales y sistémicos (Miraglia del Giudice M, De Luca MG. The role of probiotics in the clinical management of food allergy and atopic dermatitis. J Clin Gastroenterol 2004;38(6 Suppl):S84-5; Prescott S, Bjorksten B, probiotics for the prevention or treatment of allergic disease. J. Allergy Clin. Immunol. 2007;120:255-262).

En vista de lo anterior, se entenderá que es generalmente deseado suministrar productos nutricionales, productos dietéticos y, en particular fórmulas infantiles, con probióticos. El término "fórmula infantil" se refiere a una composición que satisface los requerimientos nutricionales de un infante, siendo un sustituto de la leche humana.

También se entenderá que se desea, particularmente en fórmulas infantiles, incorporar probióticos sin incorporar necesariamente bacterias vivas o de otro modo viables. De hecho, esto exige "probióticos no viables".

La investigación sobre tales probióticos no viables está en marcha. Sin embargo, como se estableció en un documento por Tao et al. (Am J. Physiol Cell Physiol. 290: C1018-C1030 (2006)), aunque los probióticos parecen mejorar el curso de muchas enfermedades, sus mecanismos de acción son entendidos de manera deficiente. Sólo recientemente se han hecho intentos para entender los mecanismos detrás de sus acciones e interacciones con la célula huésped. Se han propuesto muchos diferentes mecanismos posibles, incluyendo la sobrerregulación en la producción de mucus, mejora en la función de la barrera epitelial, aumentan la producción de IgA, aumento en la competencia por sitios de adhesión sobre el epitelio intestinal, así como la producción de ácidos orgánicos, amoníaco, peróxido de hidrógeno bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas. Respecto a esto, Tao et al. presentan un estudio sobre ciertos efectos de factores solubles de LGG. Se ha concluido que cierta bioactividad reside en una fracción de bajo peso molecular (MW < 10 kDa) de un ultra filtrado de LGG-CM. de enseñanza similar es el documento US 2007/123460. Aquí, en lugar de bacterias vivas se usan compuestos libres de bacterias, derivados de probióticos, y particularmente una fracción de bajo peso molecular (MW < 10 kDa), en el tratamiento de enfermedades particularmente inflamatorias del intestino (IBDs). Otras referencias que tocan probióticos no viables son por ejemplo el documento US 2004/208863, que en general se refiere a la acción antiinflamatoria de bacterias y productos secretados por ellas, y el documento US 7052896 que se relaciona con las propiedades antiinflamatorias y antialérgicas de péptidos producidos por especies de *Lactobacillus rhamnosus*.

El documento US 6,506,389 describe una proteína obtenible de un microorganismo no patógeno, donde dicha proteína tiene actividad de unión a la mucosa y un peso molecular DE 20-40 kD, preferiblemente 20-30 kD o un polipéptido equivalente de la misma. La esencia de la divulgación es suministrar un método de discriminación para identificación de proteínas y polipéptidos capaces de unirse de manera específica a la mucosa.

Ninguna de las referencias de la técnica previa presenta un método de fermentación y cosecha adecuadamente sencillo, de modo que a partir de LGG se obtenga un material probiótico no viable que soporte actividad antialérgica.

Además, la cosecha de productos bacterianos secretados genera un problema, y es que el medio de cultivo no puede ser desprovisto fácilmente de componentes indeseados. Esto se relaciona específicamente con productos nutricionales para sujetos relativamente vulnerables, tales como fórmulas infantiles o nutrición clínica. So se incurre en este problema si componentes específicos de un sobrenadante de cultivo son aislados primero, purificados y luego aplicados en un producto nutricional. Sin embargo, se desea hacer uso de un sobrenadante de cultivo más completo. Esto serviría para suministrar una composición que refleje mejor la acción natural de los probióticos (es decir LGG). Sin embargo, actualmente no se puede usar simplemente el sobrenadante de cultivo en sí mismo como una base para materiales probióticos no viables, para que sea usado específicamente en fórmulas infantiles y similares. Así, se desea además suministrar un método para resolver esto.

Resumen de la invención

Con objeto de atender mejor uno o más de los anteriores deseos, la invención, en un aspecto, presenta un

producto nutricional que comprende una composición que contiene una mezcla proteínica, donde dicha composición es obtenible a partir de un sobrenadante de cultivo en una fase exponencial tardía de un proceso de cultivo en lote de LGG, para uso en el tratamiento o prevención de enfermedades alérgicas.

5 En otro aspecto, la invención es realizada sobre la base de un método de cosecha desde un medio de cultivo LGG de una composición que tiene actividad antialérgica, donde el método comprende el desarrollo de LGG en un medio de cultivo adecuado, la determinación de la fase exponencial tardía de crecimiento de población de LGG, y la separación del sobrenadante de cultivo en dicha fase exponencial tardía del cultivo bacteriano.

Breve descripción de los dibujos

10 Fig. 1 muestra una gráfica que representa el incremento en la población de LGG, con el tiempo, por cultivo; aquí, la Fig. 1a representa esto con referencia a la densidad óptica (OD600) así como un cambio de pH del medio de cultivo y la Fig. 1b presenta los recuentos bacterianos determinados por técnicas de placa.

Fig. 2 muestra la producción de citoquina IL-10 para las diferentes fases MJ1, MJ2, MJ3) de cosechas de cultivo LGG;

15 Fig.3 representa la línea de tiempo de la sensibilización *in vivo* con ovoalbúmina (OVA); el modelo de ratón neonato usado en la prueba de la composición, aplicó en la invención;

Fig. 4 representa imágenes al microscopio de tejido pulmonar teñido en ratones sometidos al modelo OVA y tratamiento oral con diferentes composiciones, incluyendo LGG viable y sobrenadante de LGG;

20 Fig. 5 muestra un diagrama que representa la infiltración de células alérgicas en los pulmones de animales alérgicos a OVA; revelando reducida presencia de células alérgicas (eosinofílicas) en fluidos de lavado de pulmón tanto en ratones tratados con LGG como sobrenadante de LGG

Fig. 6 (a-c) despliega diagramas que representan las respuestas *in vitro* para tres diferentes citoquinas relevantes al proceso inflamatorio en enfermedad alérgica; los datos muestran estímulo superior de producción de citoquina supresora (IL-10) por sobrenadante de LGG.

25 Fig. 7 presenta un esquema para una investigación *in vivo* de la administración perinatal de sobrenadante de cultivo de LGG aplicada en la invención;

Fig. 8 muestra los resultados de reactividad alérgica, como se muestra por presencia reducida de células alérgicas (eosinofílicas) en fluidos de lavado de pulmón, por administración perinatal de sobrenadante de cultivo de LGG aplicado en la invención;

Descripción detallada de las realizaciones

30 En un sentido amplio, la invención se basa en la percepción según la cual del cultivo en lote de LGG puede cosecharse un sobrenadante de cultivo (que puede ser denominado también como "medio gastado"), el cual posee actividad antialérgica. En el contexto de esta invención, el término "antialérgico" incluye "actividad preventiva de alergias así como actividad terapéutica antialérgica."

35 Sin desear estar atados a la teoría, se cree que esta actividad puede ser atribuida a la mezcla de componentes (incluyendo materiales proteínicos, y posiblemente incluyendo materiales (exo)polisacáridos) como se encuentran liberados en el medio de cultivo en una etapa tardía de la fase exponencial (o "log") del cultivo en lote de LGG. En lo sucesivo la composición será denominada como "sobrenadante de cultivo aplicado en la invención."

40 LGG es una cepa probiótica aislada de la flora intestinal de un humano saludable. Fue divulgada en el documento de EEUU No. 5,032,399 de Gorbach, et al., el cual es incorporado aquí en su totalidad como referencia. LGG es resistente a la mayoría de los antibióticos, estable en presencia de ácidos y bilis, y se une de manera ávida a las células de la mucosa del tracto intestinal humano. Sobrevive por 1-3 días en la mayoría de individuos y hasta 7 días en el 30% de los sujetos. Adicionalmente a su habilidad para la colonización, LGG afecta también de manera benéfica las respuestas inmunes de la mucosa. LGG está depositado en la autoridad depositaria American Type Culture Collection bajo número de acceso ATCC 53103.

45 Las etapas reconocidas en el cultivo en lote de bacterias son conocidas por la persona experta. Estas son las fases "lag," "log" ("logarítmica" o "exponencial"), la "estacionaria" y la "muerte" (o "declinación logarítmica"). En todas las fases durante las cuales están presentes bacterias vivas, las bacterias metabolizan nutrientes del medio, y secretan (expelen, liberan) materiales hacia el medio de cultivo. Generalmente, la composición del material segregado en un punto dado de tiempo de las etapas de crecimiento, no es predecible.

En la presente invención, los materiales segregados son cosechados de una fase exponencial tardía. La fase exponencial tardía ocurre tiempo después de la fase exponencial media (que es la semivida de la duración de la fase exponencial, por ello la referencia a la fase exponencial tardía como que es la segunda mitad del tiempo entre la fase lag y la fase estacionaria). En particular, el término "fase exponencial tardía" es usado aquí refiriéndose a la porción del último cuarto del tiempo entre la fase lag y la fase estacionaria del proceso de cultivo en lote de LGG. Preferiblemente, de acuerdo con la invención, la cosecha del sobrenadante de cultivo está en un punto en tiempo de 75% a 85% de la duración de la fase exponencial, y con máxima preferencia está en aproximadamente 5/6 del tiempo transcurrido en la fase exponencial.

El término "cultivo" o "cultivación" se refiere a la propagación de microorganismos, en este caso LGG, sobre o en un medio adecuado. Tal medio de cultivo puede ser de una variedad de clases, y es en particular un caldo líquido, como es costumbre en la técnica. Un caldo preferido es por ejemplo el caldo MRS como se usa generalmente para el cultivo de lactobacillus. El caldo MRS comprende generalmente polisorbato, acetato, magnesio y manganeso, que son conocidos por actuar como factores especiales de crecimiento para lactobacillus, así como una rica base nutriente. Una composición típica comprende (cantidades en g/litros): peptona de caseína 10.0; extracto de carne 8.0; extracto de levadura 4.0; D(+)-glucosa 20.0; hidrogenofosfato de dipotasio 2.0; Tween® 80 1.0; citrato de triamonio 2.0; acetato de sodio 5.0; sulfato de magnesio 0.2; sulfato de manganeso 0.04.

Un uso preferido del sobrenadante de cultivo aplicado en la invención está en fórmulas infantiles. Con objeto de que la invención sea de total uso aquí, se desea asegurar que la composición cosechada de cultivación de LGG no contenga componentes (como pueden estar presentes en el medio de cultivo) que no son deseados, o legalmente permitidos, en tales fórmulas. Respecto al polisorbato presente regularmente en caldo MRS, el medio para el cultivo de bacterias puede incluir un tensioactivo emulsificante no iónico, por ejemplo sobre la base de sorbitano polietoxilado y ácido oleico (típicamente disponible como polisorbatos Tween®, tales como Tween® 80). Mientras estos tensioactivos son encontrados frecuentemente en productos alimenticios, por ejemplo en helado de crema, y son reconocidos generalmente como seguros, ellos no son considerados deseables o incluso aceptables en todas las jurisdicciones, para uso en productos nutricionales para sujetos relativamente vulnerables, tales como fórmulas infantiles con nutrición clínica.

Así, en una realización preferida, la presente invención también es pertinente al uso en medio de cultivo en el cual pueden evitarse los polisorbatos mencionados anteriormente. Con este fin, un medio de cultivo preferido aplicado en la invención está provisto de Tween 80 y puede incluir un ingrediente oleoso seleccionado de entre el grupo consistente en ácido oleico, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de semilla de colza, aceite de girasol y mezclas de ellos. Se entenderá que el beneficio total del ingrediente oleoso es logrado si la presencia de un tensioactivo de polisorbato es esencialmente o totalmente evitada.

Con mayor preferencia, un medio MRS está provisto de Tween 80 y comprende, adicionalmente a uno o más de los aceites, peptona (típicamente 10 g/L), extracto de carne (típicamente 8 g/L), extracto de levadura (típicamente 4 g/L), D(+) glucosa (típicamente 20 g/L), hidrogenofosfato de dipotasio (típicamente 2 g/L), trihidrato de acetato de sodio (típicamente 5 g/L), citrato de triamonio (típicamente 2 g/L), heptahidrato de sulfato de magnesio (típicamente 0.2 g/L) y tetrahidrato de sulfato manganoso (típicamente 0.05 g/L).

El cultivo es realizado generalmente a una temperatura de 20 °C a 45°C, preferiblemente a 35 °C a 40°C, y con máxima preferencia a 37°C.

El punto de tiempo preferido durante la cultivación para la cosecha del sobrenadante de cultivo, es decir en la fase exponencial tardía mencionada anteriormente, puede ser determinado por ejemplo con base en la OD600nm y concentración de glucosa. OD600 se refiere a la densidad óptica a 600 nm, que es una medida de densidad conocida que tiene correlación directa con la concentración bacteriana en el medio de cultivo.

Adicionalmente a lo anterior, debería notarse que el cultivo de lactobacillus en lote, incluyendo LGG, es conocimiento general común disponible para la persona experta en la técnica. Así, estos métodos no requieren aclaración adicional aquí.

Preferiblemente, la composición aplicada en la invención es producida mediante fermentación a gran escala (por ejemplo en un fermentador de más de 100 L, preferiblemente aproximadamente 200 L o más).

La composición aplicada en la invención puede ser cosechada por cualquier técnica conocida para la separación de sobrenadante de cultivo de un cultivo bacteriano. Tales métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, centrifugación, filtración, sedimentación y similares.

El sobrenadante puede ser usado inmediatamente, o ser almacenado para un uso futuro. En el último caso, en general el sobrenadante será refrigerado, congelado o liofilizado. El sobrenadante puede estar concentrado o diluido, según se desee.

Se cree que la composición, cosechada de acuerdo con la invención, comprende una composición proteínica. La persona experta conoce el término "proteínico", e indica que la composición comprende uno o más de péptidos, proteínas, u otros compuestos que contienen residuos de aminoácido.

5 En cuanto a sustancias químicas, se cree que la composición del sobrenadante de cultivo aplicado en la invención es una mezcla de una pluralidad de aminoácidos, oligo- y polipéptidos, y proteínas, de diferentes pesos moleculares. Además, se cree que la composición comprende estructuras de polisacáridos.

10 Se enfatiza, a diferencia de la técnica, que la invención se relaciona preferiblemente con el sobrenadante de cultivo completo, es decir no fraccionado. Se cree que la selección juiciosa de la cosecha en la fase exponencial tardía mencionada anteriormente, y la retención de virtualmente todos los componentes del sobrenadante contribuye a los resultados sorprendentes obtenidos con él, particularmente en vista de la actividad antialérgica y más particularmente en vista de tal actividad en infantes y neonatos, y mediante administración perinatal a mujeres embarazadas, respectivamente lactantes.

15 El sobrenadante de cultivo completo es definido más específicamente como sustancialmente excluyente de componentes de bajo peso molecular, en general por debajo de 6 kDa. Esto se relaciona con el hecho según el cual la composición preferiblemente no incluye ácido láctico y/o sales de lactato. Así, el sobrenadante preferido aplicado en la invención tiene un peso molecular mayor a 6kDa, en la medida en que este es el sobrenadante típico obtenido por retiro del ácido láctico y sales de lactato. Esto involucra usualmente filtración sobre cromatografía en columna. De hecho, el producto retenido en esta filtración representa un intervalo de peso molecular mayor a 6 kDa (en otras palabras, separan por filtración constituyentes de menos de 6 kDa).

20 La composición de sobrenadante aplicada en la invención será en general no sólo proteínica, sino que también comprenderá polisacáridos, en particular exopolisacáridos (polímeros de alto peso molecular compuestos por residuos de azúcar como son producidos por LGG). Sin querer estar atados a la teoría, se cree que la relación entre las cantidades de materiales proteínicos y las cantidades de materiales de carbohidrato como son cosechados de la fase exponencial tardía como se discutió anteriormente, contribuye a la naturaleza antialérgica comparada con las composiciones como son cosechadas en otras etapas, por ejemplo la fase exponencial media o la fase estacionaria.

25 El sobrenadante de cultivo cosechado de acuerdo con la invención puede ser colocado en uso de diferentes formas, de modo que se tome beneficio de la actividad antialérgica hallada. Tal uso en general involucrará alguna forma de administración de la composición aplicada en la invención al sujeto que la necesita. Respecto a esto, el sobrenadante de cultivo puede ser usado como tal, por ejemplo incorporado dentro de cápsulas para administración oral o en una composición nutricional líquida tal como una bebida, o puede ser procesado antes del uso posterior. Se prefiere esta última.

30 Generalmente tal procesamiento involucra la separación de la composición proteínica de la fase continua generalmente líquida del sobrenadante. Esto es hecho preferiblemente mediante un método de secado, tal como secado por atomización o secado por congelación (liofilización). Se prefiere el secado por atomización. En una realización preferida del método de secado por atomización, antes del secado por atomización se añadirá un material vehículo, por ejemplo maltodextrina DE29. Se cree que esto es ventajoso desde el punto de vista de la producción de un polvo seco también bajo condiciones en las cuales el ácido láctico (el cual es producido por LGG y que está presente en el medio de cultivo gastado) es un líquido.

35 Se ha hallado que la composición aplicada en la invención posee actividad antialérgica (preventiva y/o terapéutica). La actividad antialérgica puede ser determinada, por ejemplo en un modelo recientemente desarrollado de ratón neonatal de sensibilización alérgica e inflamación del pulmón. Este modelo es en efecto una adaptación del denominado modelo OVA, el cual es usado ampliamente para estudiar la patología inmune de enfermedades alérgicas y asma así como para identificar compuestos con actividad antialérgica. Las enfermedades alérgicas incluyen, pero no están limitadas a asma (que puede estar basada en alergia), eczema atópico (que también puede estar basado en alergia), alergia alimentaria y rinitis/conjuntivitis alérgicas.

40 Para que la composición aplicada en la invención ejerza su efecto benéfico, antialérgico, tiene que ser digerida por un sujeto, preferiblemente un sujeto humano. Particularmente, en una realización preferida, el sujeto es una mujer embarazada, una mujer lactante, un neonato, un infante o un niño. Como se mencionó anteriormente, las ventajas de usar un material que podría ser mirado como "probiótico no viable" será aprovechada por la mayoría en productos dietéticos para infantes. El término "infante" indica un humano postnatal de menos de aproximadamente 1 año de edad.

45 Se entenderá que la digestión por parte de un sujeto requerirá la administración oral de la composición aplicada en la invención. La forma de administración de la composición de acuerdo con la invención no es crítica. En algunas realizaciones, la composición es administrada a un sujeto mediante comprimidos, píldoras, encapsulados,

comprimidos en cápsula, cápsulas de gel, cápsulas, gotas de aceite o bolsitas. En otra realización, la composición está encapsulada en un azúcar, grasa o polisacárido.

Aún en otra realización, la composición es añadida a un alimento o bebida y consumida. El alimento o bebida puede ser un producto nutricional para niños, tal como una fórmula de seguimiento, leche de crecimiento, bebida, leche, yogur, jugo de frutas, bebida a base de frutas, comprimido masticable, galleta, galleta quebradiza o un polvo de leche. En otras realizaciones, el producto puede ser un producto nutricional para infantes, tal como una fórmula infantil o un producto de fortificación de leche humana.

La composición aplicada en la invención, bien sea añadida en una forma separada de dosificación o a través de un producto nutricional, será administrada generalmente en una cantidad efectiva en el tratamiento o prevención de alergias. La cantidad efectiva es equivalente preferiblemente a 1×10^4 a aproximadamente 1×10^{12} equivalentes celulares de bacterias probióticas vivas por kg de peso corporal por día, y más preferiblemente 10^8 - 10^9 . El cálculo inverso hasta equivalentes celulares está bien dentro del ámbito del conocimiento de la persona experta.

Si la composición aplicada en la invención es administrada a través de una fórmula infantil, la fórmula infantil puede ser nutricionalmente completa y contener tipos y cantidades adecuados de lípido, carbohidratos, proteína, vitaminas y minerales. La cantidad de lípido o grasa puede variar típicamente desde aproximadamente 3 a aproximadamente 7 g/100 kcal. Las fuentes de lípido pueden ser cualquiera conocida o usada en la técnica, por ejemplo aceites vegetales tales como aceite de palma, aceite de soja, oleína de palma, aceite de coco, aceite de triglicéridos de cadena media, aceite de girasol alto en ácido oleico, aceite de cártamo alto en ácido oleico y similares. La cantidad de proteína puede variar típicamente desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 g/100 kcal. Las fuentes de proteína pueden ser cualquiera conocida o usada en la técnica, por ejemplo leche descremada, proteína de suero, caseína, proteína de soja, proteína (parcial o extensamente) hidrolizada, aminoácidos y similares. La cantidad de carbohidratos puede variar típicamente desde aproximadamente 8 a aproximadamente 12 g/100 kcal. Las fuentes de carbohidrato pueden ser cualquiera conocida y usada en la técnica, por ejemplo lactosa, glucosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón, sólidos de jarabe de arroz y similares.

De manera conveniente, pueden usarse productos nutricionales comercialmente disponibles para prenatales, prematuros, infantes y niños. Por ejemplo, Expecta® Enfamil®, fórmula para prematuros Enfamil®, Lactofree®, Nutramigen®, Gentlease®, Pregestimil®, ProSobee®, Enfakid®, Enfaschool®, Enfagrow®, Kindercal® (disponible de Mead Johnson & Company, Evansville, Ind., EEUU) pueden ser suplementados con niveles adecuados de composición aplicada en la invención.

En una realización, la composición aplicada de la invención puede combinarse con uno o más probióticos viables. Cualquier probiótico viable conocido en la técnica puede ser aceptable en esta realización, siempre que logre el resultado pretendido.

Si un probiótico viable es administrado en combinación con la composición aplicada en la invención, la cantidad de probiótico viable puede corresponder a entre aproximadamente 1×10^4 y 1×10^{12} unidades formadoras de colonia (cfu) por kg de peso corporal por día. En otra realización, los probióticos viables pueden comprender entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^{12} cfu por kg de peso corporal y por día. Aún en otra realización, los probióticos viables pueden comprender aproximadamente 1×10^9 cfu por kg de peso corporal por día. En una realización todavía adicional, los probióticos viables pueden comprender aproximadamente 1×10^{10} cfu por kg de peso corporal por día.

En otra realización, la composición aplicada en la invención puede ser combinada uno o más prebióticos. Un "prebiótico" indica un ingrediente alimenticio no digerible que estimula el crecimiento y/o actividad de probióticos. Cualquier prebiótico conocido en la técnica será aceptable en esta realización, siempre y cuando logre el resultado deseado. Los prebióticos útiles en la presente invención pueden incluir lactulosa, gluco-oligosacáridos, inulina, polidextrosa, galacto-oligosacáridos, fructooligosacáridos, isomalto-oligosacáridos, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, xilo-oligosacáridos, y gentio-oligosacáridos.

En aún otra realización de la presente invención, la fórmula infantil puede contener otros agentes activos tales como LCPUFAs. Los LCPUFAs adecuados incluyen, pero no están limitados a ácido [alfa]-linoleico, ácido [gamma]-linoleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosapentanoico (EPA), ácido araquidónico (ARA) y/o ácido docosohexaenoico (DHA). En una realización, la composición aplicada en la invención es administrada en combinación con DHA. En otra realización, la composición aplicada en la invención es administrada en combinación con ARA. En aún otra realización, la composición aplicada en la invención es administrada en combinación con DHA y ARA. Las fórmulas infantiles comercialmente disponibles que contienen DHA, ARA, o una combinación de ellos pueden ser suplementadas con la composición aplicada en la invención y usadas en la presente invención. Por ejemplo, Enfamil® LIPIL®, que contiene niveles efectivos de DHA y ARA, está

comercialmente disponible y puede ser suplementado con la composición aplicada en la invención y utilizado en la presente invención. Si se incluye, la cantidad efectiva de ARA en una realización de la presente invención es típicamente desde aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 150 mg per kg de peso corporal por día. En una realización de esta invención, la cantidad varía desde aproximadamente 10 mg per kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 120 mg per kg de peso corporal por día. En otra realización, la cantidad varía desde aproximadamente 15 mg per kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 90 mg per kg de peso corporal por día. En aún otra realización, la cantidad varía desde aproximadamente 20 mg per kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 60 mg per kg de peso corporal por día. Si se utiliza la fórmula infantil, la cantidad de DHA en la fórmula infantil puede variar desde aproximadamente 5 mg/100 kcal hasta aproximadamente 80 mg/100 kcal. En una realización de la presente invención, DHA varía desde aproximadamente 10 mg/100 kcal hasta aproximadamente 50 mg/100 kcal; y en otra realización, desde aproximadamente 15 mg/100 kcal hasta aproximadamente 20 mg/100 kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de DHA es aproximadamente 17 mg/100 kcal. Si se usa una fórmula infantil, la cantidad de ARA en la fórmula infantil puede variar desde aproximadamente 10 mg/100 kcal hasta aproximadamente 100 mg/100 kcal. En una realización de la presente invención, la cantidad de ARA varía desde aproximadamente 15 mg/100 kcal hasta aproximadamente 70 mg/100 kcal. En otra realización, la cantidad de ARA varía desde aproximadamente 20 mg/100 kcal hasta aproximadamente 40 mg/100 kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de ARA es de aproximadamente 34 mg/100 kcal. Si se usa una fórmula infantil, la fórmula infantil puede ser suplementada con aceites que contienen DHA y ARA, usando técnicas estándar conocidas en la técnica. Por ejemplo pueden añadirse DHA y ARA a la fórmula, reemplazando una cantidad equivalente de un aceite, tal como aceite de girasol alto del ácido oleico, normalmente presente en la fórmula. Como otro ejemplo, pueden añadirse a la fórmula los aceites que contienen DHA y ARA, reemplazando una cantidad equivalente del resto de la mezcla de grasa total normalmente presente en la fórmula, sin DHA y ARA. Si se utiliza, la fuente de DHA y ARA puede ser cualquier fuente conocida en la técnica, tal como aceite marino, aceite de pescado, aceite de célula individual, lípido de yema de huevo, líquido cerebral y similares. En algunas realizaciones, los DHA y ARA son suministrados por el aceite Martek de célula individual, DHASCO®, o variaciones de él. El DHA y ARA pueden estar en forma natural, siempre y cuando el resto de la fuente de LCPUFA no dé como resultado ningún efecto perjudicial sustancial en el infante. De modo alternativo el DHA y ARA pueden ser usados en forma refinada. En una realización de la presente invención, son fuentes de DHA y ARA los aceites de célula individual como lo enseñan los documentos 5,374,567; 5,550,156; y 5,397,591, cuyas divulgaciones se incorporan aquí en su totalidad como referencia. Sin embargo, la presente invención no está limitada sólo a tales aceites. En una realización, se usa una fuente de LCPUFA que contiene EPA en combinación con al menos una composición aplicada en la invención. En otra realización, se usa una fuente de LCPUFA que está sustancialmente libre de EPA, en combinación con al menos una composición aplicada en la invención. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, se suplementa una fórmula infantil que contiene menos de 16 mg EPA/100 kcal, con la composición aplicada en la invención. En otra realización, se suplementa una fórmula infantil que contiene menos de aproximadamente 10 mg EPA/100 kcal, con la composición aplicada en la invención. En todavía otra realización, se suplementa una fórmula infantil que contiene menos de aproximadamente 5 mg EPA/100 kcal, con la composición aplicada en la invención.

Otra realización de la invención incluye una fórmula infantil suplementada con la composición aplicada en la invención, que está libre de cantidades incluso trazas de EPA. Se cree que el suministro de una combinación de la composición aplicada en la invención con DHA y/o ARA suministra efectos complementarios o sinérgicos respecto a las propiedades antialérgicas de formulaciones que contienen estos agentes.

En una realización preferida adicionalmente, el producto dietético para uso de acuerdo con la invención comprende uno o más materiales bio-activos normalmente presentes en la leche humana de pecho, tal como proteínas o polisacáridos.

La composición aplicada en la invención es usada preferiblemente con objeto de prevenir, reducir, mejorar o tratar alergias y/o síntomas de ellas.

Se define alergia como una "hipersensibilidad anormal a una sustancia que es normalmente tolerada y generalmente considerada inofensiva." Los síntomas de alergias pueden variar desde un flujo nasal hasta un choque anafiláctico. Cerca de 50 millones de estadounidenses sufren de enfermedades alérgicas, y la incidencia de estas enfermedades está aumentando.

Hay dos fases básicas involucradas en la respuesta alérgica. La primera etapa involucra el desarrollo de la fase temprana de una respuesta de hipersensibilidad de tipo inmediato a los alérgenos. La primera vez que un alérgeno encuentra el sistema inmune, no ocurre reacción alérgica. En lugar de ello, el sistema inmune se prepara para futuros encuentros con el alérgeno. Los macrófagos, que son células carroñeras, y las denominadas células dendríticas rodean y rompen el alérgeno invasor. Las células entonces despliegan los fragmentos de alérgeno sobre sus paredes celulares a los linfocitos T, los cuales son los principales coordinadores de la reacción inmune

del cuerpo. Esta señal cognitiva más varias señales no cognitivas (por ejemplo citoquinas) activan las células T vírgenes e instruyen la diferenciación de células T en subpoblaciones de efector de célula T. vírgenes Los jugadores clave en la cascada alérgica son las células T del fenotipo Th-2 (TH-2). Las células T de tipo TH-2 se caracterizan por la secreción de varias citoquinas incluyendo interleuquina-4 (IL-4), IL-5 y IL-13. Las citoquinas IL-4 y IL-13 activan entonces los linfocitos B para producir anticuerpos de la subclase E (IgE) que se dirigen contra el alérgeno particular. La interacción de anticuerpos IgE específicos sobre la superficie de las células efectoras (mastocitos y basófilos) con un alérgeno, desencadena la fase temprana de respuesta de hipersensibilidad de tipo inmediato.

Esta activación de mastocitos ocurre usualmente dentro de minutos después de la segunda o adicional exposición a un alérgeno. Los anticuerpos IgE sobre los mastocitos, construidos durante la fase de sensibilización, reconocen el alérgeno y se unen al invasor. Una vez que el alérgeno está unido al receptor, los gránulos en los mastocitos liberan sus contenidos. Estos contenidos, o mediadores, son sustancias proinflamatorias tales como histamina, factor activador de plaquetas, prostaglandinas, citoquinas y leucotrienos. Estos mediadores realmente desencadenan el ataque alérgico. La histamina estimula la producción de moco y causa enrojecimiento, hinchamiento e inflamación. Las prostaglandinas constriñen las vías respiratorias y agrandan los vasos sanguíneos.

La segunda fase de la respuesta inmune alérgica está caracterizada por la infiltración de células inflamatorias, tales como eosinófilos, en las vías respiratorias después de la exposición al alérgeno. Una asociación importante entre la sensibilización y la inflamación está representada por las células T que segregan mediadores no sólo involucrados en la síntesis de IgE, sino que también son responsables por el reclutamiento, activación y supervivencia de eosinófilos. El tejido de mastocitos y células circundantes producen mensajeros químicos que dan señal a los basófilos, eosinófilos y otras células circulantes, para que migren dentro de ese tejido y ayuden a luchar contra el material extraño. Los eosinófilos secretan sustancias químicas por sí mismos, que sostienen la inflamación, causan daño de los tejidos, y reclutan aún más células inmunes. Esta fase puede ocurrir en cualquier momento entre varias horas y varios días después de la exposición alérgica, y puede durar horas e incluso días.

La alergia respiratoria es un tipo particular de alergia que afecta el tracto respiratorio. El revestimiento de las vías respiratorias desde la nariz hasta los pulmones es similar en estructura, y frecuentemente es afectado de modo similar por el proceso alérgico. Por ello, un alérgeno que afecta la nariz o senos también podría afectar los pulmones.

Por ejemplo, la rinitis alérgica, también conocida como fiebre del heno, es causada por reacciones alérgicas de las membranas mucosas en la nariz y vías respiratorias, a los alérgenos en el aire. Los síntomas de rinitis alérgica incluyen frecuentemente picazón en la nariz, garganta y ojos y excesivos estornudos. Frecuentemente sigue congestión y flujo nasal.

Dado que los alérgenos en un área del tracto respiratorio pueden afectar otras áreas del tracto respiratorio, la rinitis en los pasajes nasales puede conducir a asma, la cual es una enfermedad mucho más seria que ocurre en las vías respiratorias inferiores de los pulmones. El asma se caracteriza por el desarrollo de hiperreactividad de las vías respiratorias, disnea, sibilancias en la exhalación, tos seca y un sentimiento de opresión en el pecho. La exposición repetida a un alérgeno puede sostener la respuesta inmune inflamatoria en las vías respiratorias, dando como resultado una remodelación de las vías respiratorias, comúnmente conocida como asma crónica. No toda persona con rinitis alérgica desarrollará síntomas de asma, pero un número significativo, especialmente aquellos con alergias recurrentes no tratadas, mostrarán cambios de inflamación de los pulmones. Cerca de 40% de la gente con rinitis alérgica desarrollará realmente asma en estado avanzado.

Si la inflamación nasal que acompaña la rinitis alérgica alcanza los senos, el resultado puede ser una infección incómoda llamada sinusitis, o rino-sinusitis, en la cual los senos no pueden vaciarse a sí mismos de bacterias. Los síntomas incluyen congestión nasal, flujo nasal, garganta adolorida, fiebre, dolor de cabeza, fatiga y tos, así como dolor en la frente, detrás de las mejillas, e incluso dolor de dientes y mandíbula.

Las alergias respiratorias son una de las afecciones más comunes de la infancia. Como con los adultos, las alergias respiratorias en niños aparecen con mayor probabilidad en la forma de rinitis alérgica y asma.

La prevención de alergias respiratorias es especialmente importante en infantes y niños pequeños, dado que parece que la sensibilización alérgica temprana a los alérgenos está asociada con un retraso en la maduración de las respuestas inmunes normales. Adicionalmente, la sensibilización alérgica es considerada generalmente el primer paso en el desarrollo de enfermedad atópica. Baena-Cagnani, Role of Food Allergy in Asthma in Childhood, Allergy. Clin. Immun. 1(2):145-149 (2001). Frecuentemente, el asma que comienza temprano en la vida está asociada con la atopía, así la sensibilización alérgica temprana parece jugar un papel importante en el asma persistente también. Martinez, F., Development of Wheezing Disorders and Asthma in Preschool Children, Pediatr.

109:362-367 (2002).

5 No sólo hay una fuerte asociación entre la sensibilización alérgica y el asma, sino que la asociación parece ser dependiente de la edad. Aunque algunos niños se toman sensibilizados por los alérgenos durante los primeros pocos años de vida, la gran mayoría de aquellos que se tornan sensibilizados durante este período desarrollan más tarde en la vida síntomas similares al asma. Martínez, F., Viruses and Atopic Sensitization in the First Years of Life, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162:S95-S99 (2000). Así, es importante encontrar vías para prevenir la sensibilización temprana a los alérgenos, reactividad alérgica, y prevenir alergias respiratorias más tarde en la vida.

10 Existe evidencia creciente de que muchos aspectos de salud y enfermedad son determinados no sólo durante la infancia, sino también durante el embarazo. Esto es especialmente cierto con enfermedades alérgicas, donde las respuestas inmunes en el nacimiento implican exposición intrauterina como un evento de sensibilización primaria. Por ejemplo, las células T específicas de alérgenos están ya presentes en el nacimiento, y la sensibilización temprana a los alérgenos alimentarios es identificada como predictor de desarrollo posterior de alergias respiratorias. IHi, et al., *The Natural Course of Atopic Dermatitis from Birth to Age 7 Years and the Association with Asthma*, *Clin. Exp. Allergy* 27:28-35 (1997). Adicionalmente, el desarrollo de los pulmones comienza muy temprano después de la fertilización y continúa por al menos dos o tres años después del nacimiento. Así, tanto el desarrollo prenatal como postnatal de las rutas respiratorias, son importantes en la patogénesis de alergias respiratorias en infantes y niños.

20 También se ha mostrado que el feto humano desarrolla células B que producen IgE, temprano en la gestación y que es capaz de producir anticuerpos IgE en respuesta a estímulos antigénicos apropiados, de una manera análoga a las bien reconocidas respuestas IgM que se observan en diferentes infecciones prenatales. Weil, G., et al., *Prenatal Allergic Sensitization to Helminth Antigens in Offspring of Parasite-Infected Mothers*, *J. Clin. Invest.* 71 :1124-1129 (1983). Esto ilustra también la importancia de prevenir la sensibilización alérgica tanto prenatal como postnatal, a los alérgenos respiratorios.

25 [0068] Las medicaciones tradicionales para alergias respiratorias incluyen antihistamínicos, esteroides nasales tópicos, descongestionantes, y solución de cromolina. Como una alternativa a las medicaciones tradicionales, los probióticos han emergido como tratamientos posibles para ciertos tipos de alergias. Con referencia a las limitaciones mencionadas anteriormente en el uso de probióticos viables o vivos, la presente invención es de particular beneficio en la sustitución de tales probióticos en productos que sirven para prevenir, reducir, mejorar o tratar enfermedades alérgicas y/o síntomas de los mismos. Con este fin, la composición es administrada preferiblemente a través de un producto dietético nutricional, más preferiblemente una fórmula o composición nutricional prenatal, para infantes o niños, un alimento médico, o un alimento para propósitos médicos específicos (es decir un alimento etiquetado para un propósito médico definido), más preferiblemente una fórmula infantil, o nutrición perinatal para mujeres embarazadas o lactantes, como se discute sustancialmente a continuación. Adicionalmente, la invención también habilita el suministro de probióticos en una forma mejorada. Por XX, los materiales derivados de probióticos no viables de acuerdo con la invención pueden ser producidos de una manera estandarizada y reproducible en un ambiente industrial, evitando aquellos problemas que son inherentes a los probióticos vivos. También, en virtud de la naturaleza no viable y particularmente cuando se suministran como un polvo seco, ellos pueden ser incorporados y dosificados de manera adecuada en composiciones nutricionales, para la prevención o tratamiento de reactividad o enfermedades alérgicas.

A continuación será ilustrada la invención con referencia a los siguientes ejemplos, no limitantes, y las figuras acompañantes.

Ejemplo 1

45 En un proceso de fermentación en lote, se cultivó LGG bajo condiciones fisiológicas. Se mantuvo constante el pH a pH de 6 mediante adición de NaOH al 33%, se mantuvo la temperatura a 37°C. La velocidad del agitador fue 50 rpm, se purgó el espacio de cabeza con N₂. Se suministró el siguiente medio de cultivo (un caldo MRS adaptado) (Tabla 1).

Tabla 1

| Componente | (g) |
|--|-----|
| Solución 1 (separadamente en autoclave a 110 °C) | |
| Glucosa·H ₂ O | 66 |

| | |
|---|----------------|
| Agua desmineralizada | 84 |
| Solución 2 (en autoclave a 121 °C) | |
| Tween-80 | 2.0 |
| Acetato de Na·3 H ₂ O | 10.0 |
| NH ₄ Cl | 2.6 |
| Componente | (g) |
| Na ₃ -citrato·2 H ₂ O | 4.8 |
| K ₂ HPO ₄ | 4.0 |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 0.4 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 0.08 |
| Extracto de levadura (Gistex LS, polvo) | 46 |
| Agua desmineralizada | 780 |
| Total | 1 kg del medio |

En las Figuras 1 (a) y (b) se representa el crecimiento bacteriano.

5 La Fig. 1a muestra la evolución del pH, la cantidad de NaOH (33%) titulada (base DM = base de Vigilancia de Dosificación) y OD600 durante la fermentación de LGG. Se hace referencia a la leyenda dada en la figura. Las mediciones de pH y OD600 permiten una determinación del crecimiento bacteriano en el fermentador; aquí la adición de NaOH requerida para mantener el pH a 6 tiene correlación con la producción de lactato (es decir una medida de la actividad metabólica bacteriana) y OD 600 es una medición de densidad que tiene correlación con el número de bacterias en el fermentador.

10 En la Fig. 1b el eje vertical indica, sobre una escala logarítmica, el recuento bacteriano en el medio de cultivo. El eje horizontal indica tiempo.

Se tomaron muestras del sobrenadante de cultivo en tres puntos de tiempo (indicados como MJ1, MJ2, y MJ3 en las figuras).

Ejemplo 2

15 De manera análoga al Ejemplo 1, se condujo el cultivo de LGG sobre la base de medio de cultivo modificado. Aquí estaba ausente Tween, y se añadió un aceite como sigue:

- (a) Ácido oleico en 1 g/kg, 2 g/kg y 4 g/kg de concentración.
- (b) Aceite de linaza en 1 g/kg, 2 g/kg y 4 g/kg de concentración.
- (c) Aceite de oliva en 1 g/kg, 2 g/kg y 4 g/kg de concentración.
- (d) Aceite de colza en 1 g/kg, 2 g/kg y 4 g/kg de concentración.
- 20 (e) Aceite de girasol en 1 g/kg, 2 g/kg t 4 g/kg de concentración.

En todas estas pruebas (a)-(e), se observa un crecimiento exitoso de LGG, comparable al crecimiento en el medio que contenía Tween. Adicionalmente a esto, de modo sorprendente se cultivó también exitosamente LGG sin la adición de Tween o cualquiera de los aceites.

Ejemplo 3

25 En este ejemplo, los sobrenadantes obtenidos como en el Ejemplo 1, fueron sometidos a un cribado respecto a la actividad antialérgica y antiinflamatoria, usando un modelo *in vitro* de célula (línea celular de macrófago de ratón) RAW 264, aceptado en la técnica. Los cultivos celulares RAW mostraron un incremento sustancial en la

producción de la citoquina IL-10 reguladora durante la incubación con la cosecha de muestra de sobrenadante MJ2 del cultivo LGG, comparada con las otras cosechas de muestra de sobrenadante. Véase la Fig. 2.

Ejemplo 4

5 Se realizó una comparación entre el sobrenadante MJ2 de cultivo obtenido en el Ejemplo 1 y bacterias viables LGG, en un modelo de sensibilización con ovoalbúmina (OVA). Este modelo *in vivo*, bien aceptado en la técnica, es aplicado normalmente a los ratones adolescentes o adultos. En este Ejemplo, se adaptó el modelo convencional de modo que permitiera el estudio de alergia de modo temprano en la vida.

10 [0079] Así, los ratones Balb/C neonatos recibieron LGG o sobrenadante de cultivo LGG completo cada dos días por seis semanas mediante administración intragástrica. Los animales fueron sensibilizados a la ovoalbúmina (OVA) dos veces los días 42 y 56, seguido por desafío posterior y exposición a un aerosol de OVA los días 61, 62, y 63. En la Fig.3 se muestra este esquema de tiempo. Se evaluaron los parámetros de asma bronquial experimental mediante análisis de la función pulmonar, histología, y lavado broncoalveolar (BAL). Se evaluó la reactividad alérgica sistémica mediante niveles de anticuerpos y respuestas de citoquina. Estas últimas fueron medidas en el lavado broncoalveolar (BAL) así como en cultivos celulares de drenaje de nodos reestimulados de linfa.

20 Se encontró que tanto la exposición a LGG viable así como a sobrenadante de LGG reducía la inflamación de las vías respiratorias y la hiperplasia de células de copa. La tinción histológica de secciones de tejido pulmonar (véase Fig.4) mostró aumento en el infiltrado de células inflamatorias e hiperplasia en células de copa en los animales alérgicos a OVA, mientras los animales tratados con LGG o sobrenadante de LGG mostraron arquitectura e histología pulmonar casi normales. En la Fig. 4 "control negativo" indica: ni desafío, ni sujeto a LGG o sobrenadante de LGG; "control positivo" indica: sujeto a desafío con OVA, no a LGG o a sobrenadante de LGG; "LGG viable" indica: sujeto a desafío con LGG viable; "sobrenadante de LGG" indica: sujeto a desafío y a tratamiento con sobrenadante de LGG aplicado en la invención.

25 Además, se determinó la ocurrencia de células inflamatorias que se infiltran (eosinófilos). La Fig. 5 muestra que el aumento en la infiltración de eosinófilos en los pulmones de animales alérgicos a OVA fue reducido fuertemente mediante tratamiento con LGG viable o sobrenadante de LGG. En la Fig.5, el eje vertical indica el porcentaje de incremento de células alérgicas. En el eje horizontal se representan las siguientes muestras: "control negativo": sin desafío de OVA; sin tratamiento; "control positivo": desafío con OVA; sin tratamiento; "LGG completo": desafío con OVA seguido por tratamiento con LGG viable; "sobrenadante de LGG": desafío con OVA seguido por tratamiento con sobrenadante de LGG aplicado en la invención.

Ejemplo 5

35 Este ejemplo refleja una determinación (conducida de una manera conocida) del cultivo *in vitro* de células aisladas de nodos de linfa. El perfil típico de citoquina Th2 en cultivos de nodos reestimulados de linfa de ratones alérgicos a OVA, mostró aumento en las respuestas y IL-5, y bajas respuestas y IL-10 e IFN. El tratamiento con LGG entero (viable) o sobrenadante de LGG aplicado la invención reveló efectos antialérgicos como revela el descenso en la respuesta a IL-5 y fuerte estimulación de producción de IFN- γ y IL-10 en estos cultivos. Esto está representado en la Fig.6.

Ejemplo 6

40 Este ejemplo representa la administración perinatal de sobrenadante de cultivo LGG aplicado en la invención, en el modelo de alergia a ovoalbúmina (OVA) en ratones Balb/C. Madres embarazadas y lactantes recibieron administración intragástrica de sobrenadante de LGG, cada dos días. Su descendencia fue sensibilizada y desafiada con OVA. En la Fig. 7 se ilustra un esquema de esta prueba.

45 Se evaluaron parámetros de asma bronquial experimental mediante análisis de la función pulmonar, histología y lavado broncoalveolar (BAL). Se evaluó la reactividad alérgica sistémica mediante niveles de anticuerpo y respuestas a citoquina. Esta última fue medida tanto en BAL como también en cultivos de nodos de linfa que drenan. Fig. 8 indica los resultados, en diagramas que se explican por sí mismos, revelando reducción en la infiltración de células inflamatorias (eosinófilos, macrófagos) en los animales tratados con sobrenadante de LGG.

Reivindicaciones

1. Un producto nutricional que comprende una composición que incluye una mezcla proteínica, donde dicha composición es obtenible de un sobrenadante de cultivo en una fase exponencial tardía de un proceso de cultivación en lote de LGG, para uso en el tratamiento o prevención de enfermedades alérgicas.
- 5 2. Un producto nutricional para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición es obtenible mediante un proceso que comprende los pasos de (a) someter LGG a cultivación en un medio de cultivo adecuado usando un proceso de lote; (b) cosechar el sobrenadante de cultivo en una fase exponencial tardía del paso de cultivación, fase que es definida con referencia a la segunda mitad del tiempo entre la fase lag y la fase estacionaria del proceso de cultivación en lote LGG; (c) opcionalmente retirar constituyentes de bajo peso molecular del sobrenadante de modo que se retienen constituyentes con peso molecular por encima de 6 kDa; (d) 10 retirar el contenido líquido del sobrenadante de cultivo, de modo que se obtiene la composición.
3. Un producto nutricional para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la fase exponencial tardía está definida con referencia a la porción del último cuarto del tiempo entre la fase lag y la fase estacionaria del proceso de cultivación en lote de LGG, preferiblemente 0.75-0.85 del tiempo transcurrido en la fase exponencial.
- 15 4. Un producto nutricional para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cultivación en lote de LGG es conducida en un medio de cultivo provisto de Tween 80, donde opcionalmente el medio contiene un ingrediente oleoso seleccionado del grupo consistente en ácido oleico, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de colza, aceite de girasol y mezclas de ellos.
5. Un producto nutricional para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la 20 cultivación en lote de LGG es conducida a un pH neutro, preferiblemente pH 6, a temperatura fisiológica, preferiblemente 37°C.
6. Un producto nutricional para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en una forma seca, preferiblemente seca por atomización o seca por congelación.
7. Un producto nutricional para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se añade al sobrenadante un 25 material vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como maltodextrina DE29, seguido de secado por atomización.
8. El producto nutricional para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que el producto nutricional es una fórmula infantil o para niños, que es nutricionalmente completa con respecto a la presencia de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales.
9. El producto nutricional para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el producto 30 nutricional comprende además uno o más ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), preferiblemente ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA's) tales como ácido araquidónico (ARA) o ácido docosahexaenoico (DHA).
10. El producto nutricional para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el 35 producto nutricional comprende además uno o más ingredientes bio-activos, tales como proteínas o polisacáridos, normalmente presentes en la leche humana de pecho.
11. El producto nutricional para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el producto nutricional comprende además uno o más prebióticos, seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en oligosacáridos no digeribles, polisacáridos no digeribles, y mezclas de ellos.
- 40 12. El producto nutricional para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el producto nutricional es una fórmula o composición nutricional o suplemento prenatal, infantil o para niños, un alimento médico, o un alimento para propósitos médicos específicos.

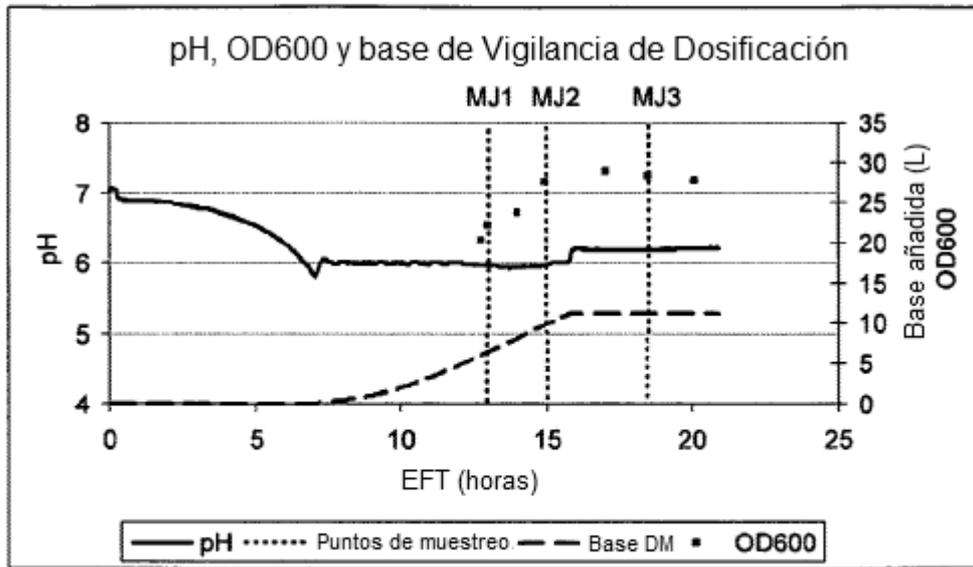


Fig. 1a

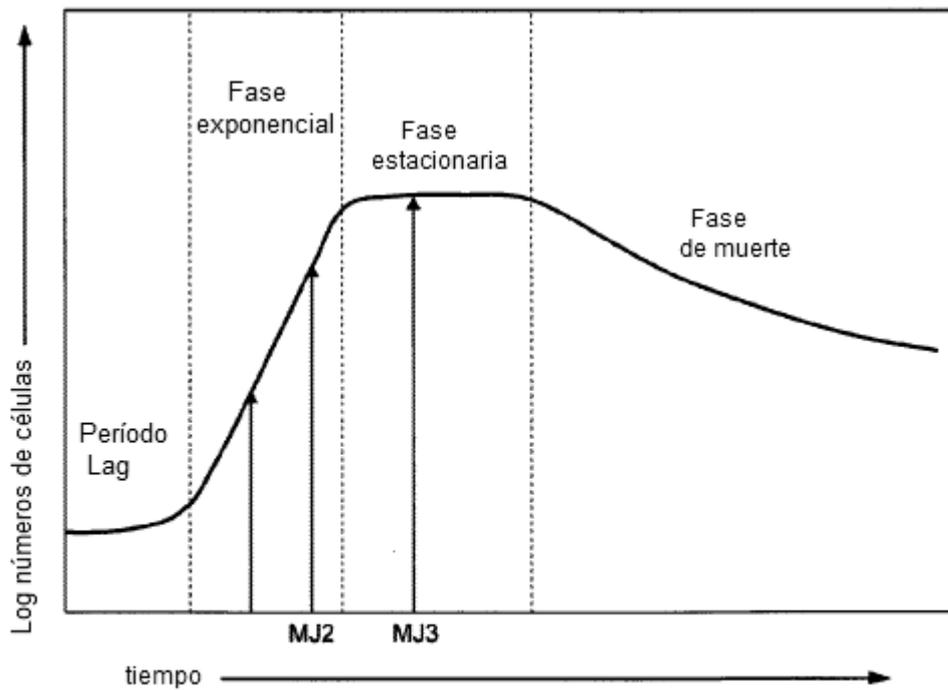


Fig. 1b

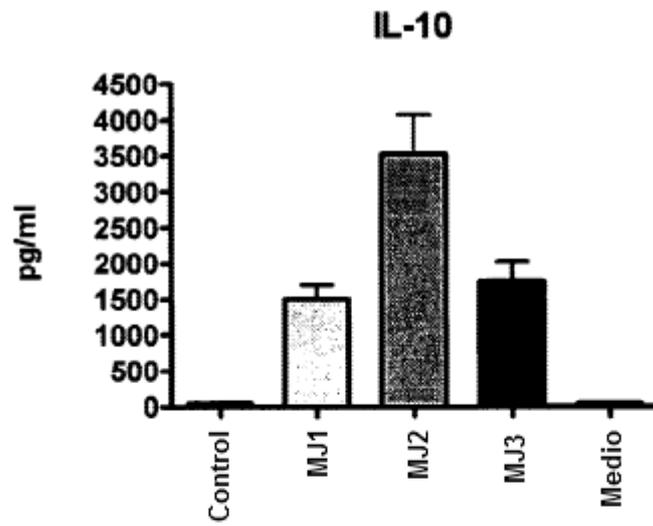


Fig. 2

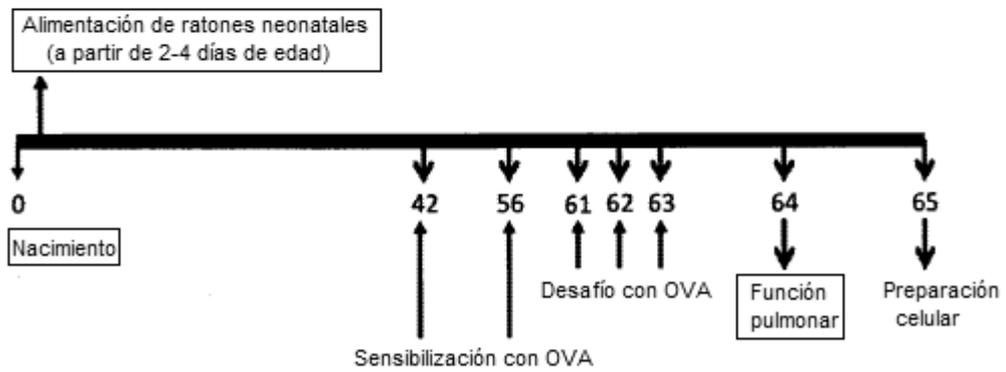
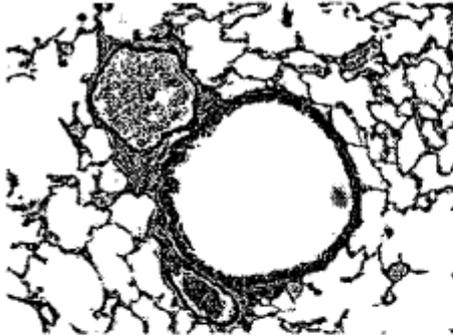
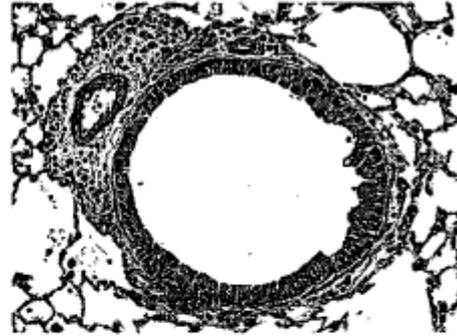


Fig. 3

Control negativo



Control positivo



LGG viable



Sobrenadante de LGG

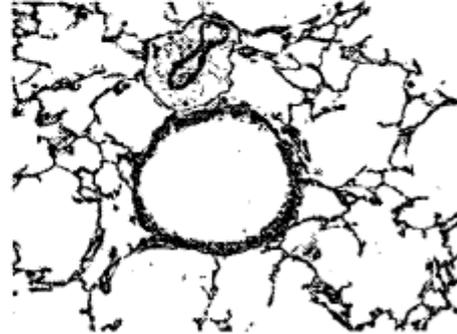


Fig. 4

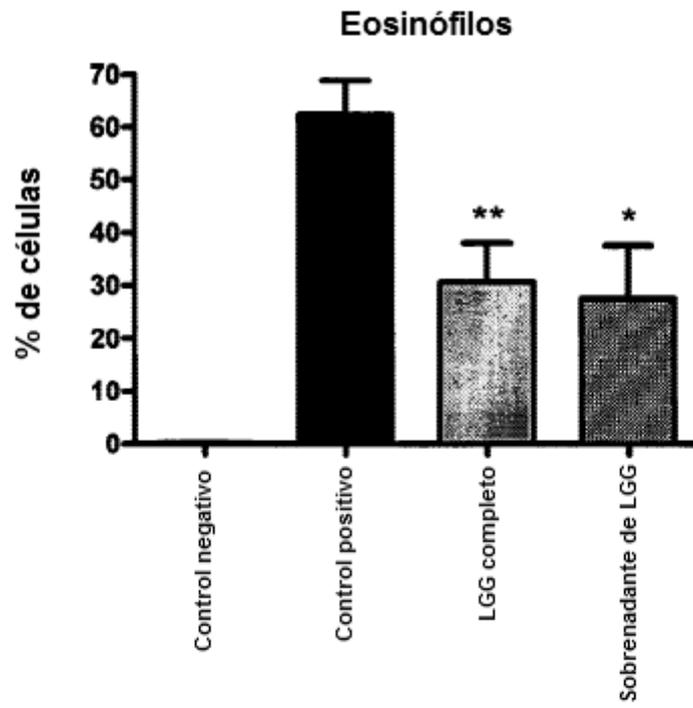


Fig. 5

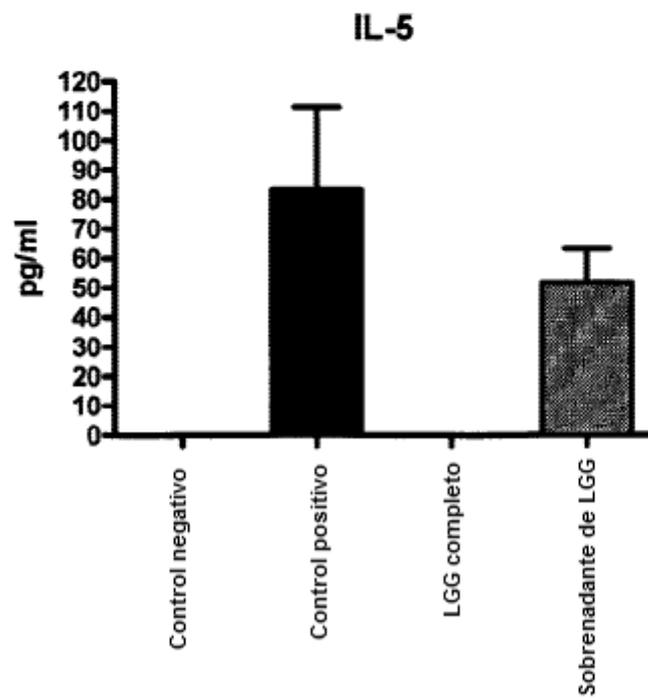


Fig. 6a

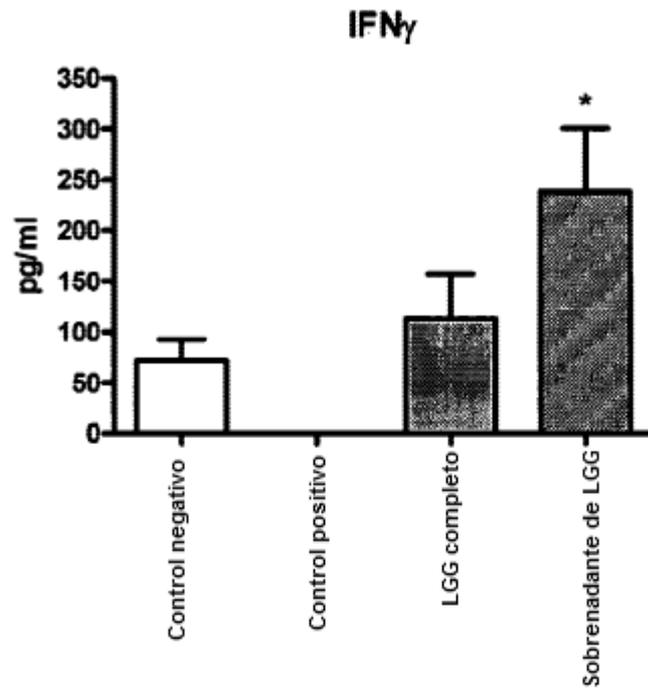


Fig. 6b

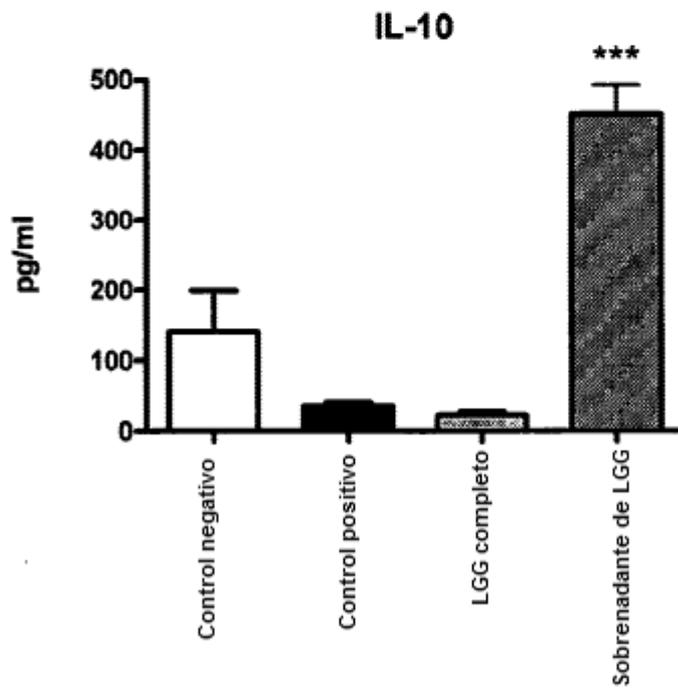


Fig. 6c

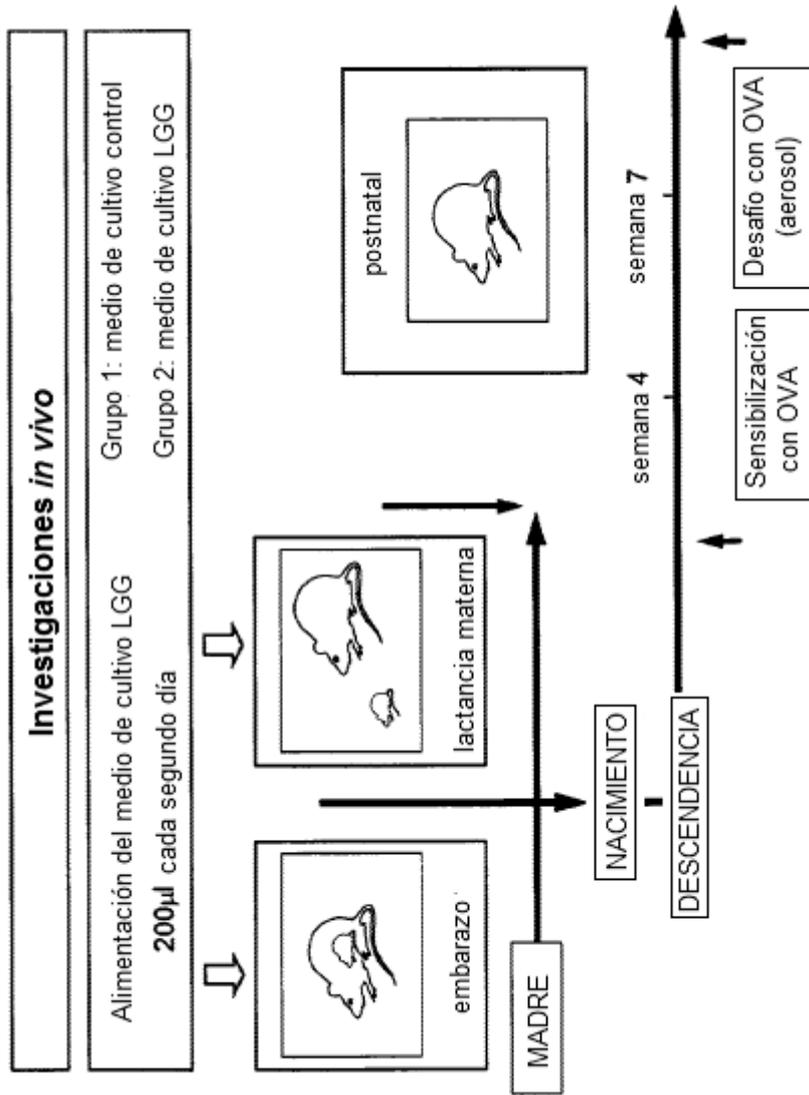


Fig. 7

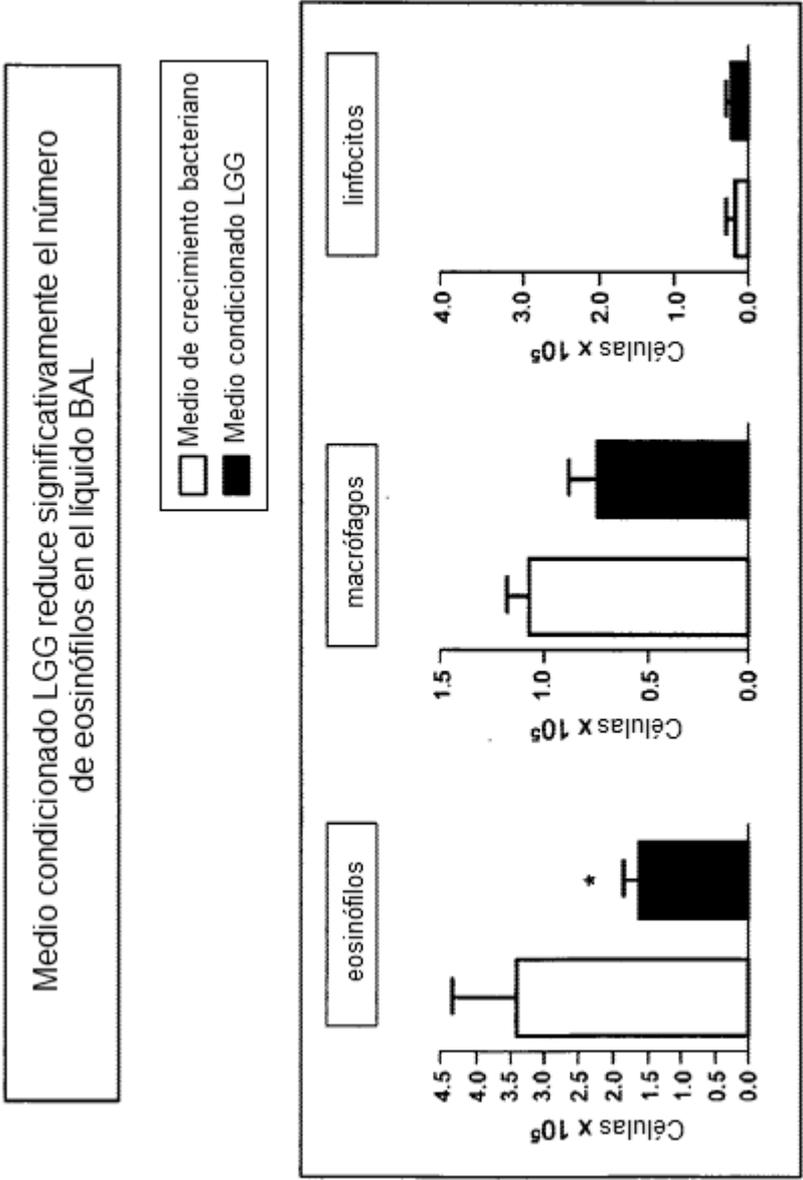


Fig. 8