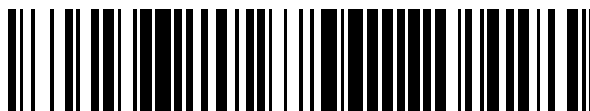


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 827**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
A61P 15/14 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2005** **E 16165460 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017** **EP 3061458**

54 Título: **Producto de aceite para mejorar la lactancia con leche materna para reducir el riesgo de alergia**

30 Prioridad:

03.06.2004 US 860201

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

30.10.2017

73 Titular/es:

BIOGAIA AB (100.0%)
Box 3242
103 64 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

MÖLLSTAM, BO;
BJÖRKSTÉN, BÉNGT y
SJÖBERG, ELISABETH

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 639 827 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

Producto de aceite para mejorar la lactancia con leche materna para reducir el riesgo de alergia

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere a un producto de aceite que comprende bacterias del ácido láctico para mejorar la leche materna para alimentar a bebés.

Descripción de la técnica relacionada

15 La hipótesis de la higiene de enfermedades alérgicas sugiere que los cambios ambientales en el mundo industrializado han conducido a un contacto microbiano reducido a una edad temprana y, por tanto, han dado como resultado la epidemia creciente de enfermedades alérgicas tales como eccema atópico, rinoconjuntivitis alérgica y asma. Un cambio ambiental de este tipo que se ha tratado es el cambio en la ingesta de microbios naturales de diversos tipos debido a la mejora de la higiene, el nivel de vida, los hábitos alimentarios, etc. Esto ha conducido a variaciones en la composición de nuestra microflora intestinal natural (*Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001; 108: 516-520) y también a cambios en la composición de la leche materna de una madre lactante. Tales cambios se han conectado con la prevalencia de alergias de diversos tipos. También se ha notificado que los bebés que nacen después en familias grandes tienen un riesgo reducido de alergia en comparación con sus hermanos que nacieron antes (los primeros de la progenie). Esto puede implicar que la leche materna de una madre "mejora" con el número creciente de embarazos.

25 La leche humana contiene una variedad de componentes importantes en el sistema inmunitario, tales como macrófagos, inmunoglobulinas o proteínas antimicrobianas, que se piensa que protegen frente a infección e inflamación en el tubo gastrointestinal y en las vías respiratorias de los hijos alimentados con leche. Además, se ha tratado la presencia de otros factores potencialmente inmunomoduladores (por ejemplo, oligosacáridos complejos, factores de crecimiento, enzimas, hormonas o citocinas). Estas propiedades beneficiosas, junto con la alta disponibilidad de nutrientes y el bajo contenido de antígenos de la leche humana son la base fisiológica de la actual recomendación por expertos pediátricos de que la leche materna es el mejor alimento para los bebés, especialmente aquellos con antecedentes familiares de alergias.

35 Por tanto, se sabe que la leche materna contiene una serie de citocinas y quimiocinas que podrían afectar potencialmente al desarrollo de alergias en el bebé. Se ha notificado previamente que los componentes que modulan las reacciones alérgicas, tales como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, se secretan en la leche en diversas etapas de la lactancia (S Rudloff *et al.*, *Allergy* 1999, 54, 206-211). Las citocinas o quimiocinas podrían ser o bien beneficiosas o bien desventajosas para el bebé lactante.

40 También se sabe que las citocinas liberadas por la leche materna de animales tienen la capacidad de sobrevivir al paso a través del tubo GI de los hijos. Por ejemplo, los ratones deficientes en TGF-beta-1 homocigotos mueren de enfermedad inflamatoria generalizada tras el destete, salvándose presuntamente hasta el destete por la transferencia de TGF-beta liberado en la leche materna (Kulkarni AB *et al.*, *Am J Pathology* 1993; 143, 3-9). El TGF-beta sobrevive el paso hasta llegar al colon. La IL-10 probablemente también sobrevive de esta manera y, por tanto, la liberación de la leche materna permite a la IL-10 alcanzar el tubo GI e inducir potencialmente efectos antiinflamatorios beneficiosos.

50 Además, Hawkes JS *et al.* (*Lipids* 2001 Oct 36:1179-81) notificaron que se habían asociado ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con aspectos de la regulación inmunitaria incluyendo la producción de citocinas. El fin de este estudio era investigar el efecto de los complementos alimenticios maternos con aceite de atún, rico en ácido docosahexaenoico (DHA), sobre la concentración del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta-1) y TGF-beta-2 en la leche materna. En este ensayo aleatorizado de intervención alimenticia, las madres de recién nacidos a término consumieron un complemento diario de 2000 mg de aceite que contenía o bien placebo (n = 40), 300 mg de DHA (n = 40) o bien 600 mg de DHA (n = 40). El aumento de DHA en la leche y el plasma fue proporcional al DHA alimenticio. No hubo relación entre el estado de DHA de leche y los niveles de TGF-beta-1 y TGF-beta-2.

60 La IL-10 es una citocina antiinflamatoria bien documentada y aceptada. La implicación es que tendrá efectos antiinflamatorios en el tubo GI del bebé. Esto es bueno para el bebé, (en general se considera que la leche materna es antiinflamatoria para el bebé en el sentido de que el bebé no debe reaccionar en exceso a patógenos/infecciones que aparecen en el intestino en una etapa temprana de la vida). Además, los datos de animales señalan los posibles beneficios para los hijos de la IL-10 en la leche. Un grupo australiano estudió un modelo animal en el que se investigó la alergia a las garrapatas. Los animales que dieron negativo en una prueba de punción (SPT) para garrapatas tenían producción de IL-10 e IL-4, atenuando la IL-10 a la IgE (respuesta alérgica) y no mostrando alergia los animales. En los animales de SPT +ve (histamina) alérgicos, sólo se produjo IL-4 y no hubo producción de IL-10.

Por tanto, no se redujo la IgE y prevaleció la alergia. Por tanto, la IL-10 atenúa los efectos inductores de alergia de IgE y pueden prevenir el desarrollo de alergias.

5 TGF-beta-2 (factor de crecimiento transformante) es también un factor de crecimiento/citocina bien documentado. Sus fuentes incluyen, por ejemplo, plaquetas que producen cantidades en miligramos de TGF-beta/kilogramo. El factor y sus isoformas (véase a continuación) también pueden aislarse de otros tejidos (TGF en microgramos/kg) y se encuentra predominantemente en el bazo y tejidos óseos. La leche humana también contiene este factor y se sintetiza también, por ejemplo, por macrófagos (TGF-beta-1), linfocitos (TGF-beta-1), células endoteliales (TGF-beta-1), queratinocitos (TGF-beta-2), células de la granulosa (TGF-beta-2), condrocitos (TGF-beta-1), células de glioblastoma (TGF-beta-2), células de leucemia (TGF-beta-1).

15 Según el tipo de célula y las condiciones, la secreción de TGF-beta puede inducirse por varios estímulos diferentes incluyendo esteroides, retinoides, EGF (factor de crecimiento epidérmico), NGF, activadores de linfocitos, vitamina D3 e IL1. La síntesis de TGF-beta puede inhibirse por EGF, FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), dexametasona, calcio, retinoides y hormona foliculoestimulante. TGF-beta también influye en la expresión de sus propios genes y esto puede ser importante en la cicatrización. TGF-beta existe en al menos cinco isoformas, conocidas como TGF-beta-1, TGF-beta-2, TGF-beta-3, TGF-beta-4, TGF-beta-5, que no están relacionadas con TGF-alfa. Las secuencias de aminoácidos de estas isoformas presentan homologías del orden del 70-80 por ciento. TGF-beta-1 es la forma prevalente y se encuentra casi de manera omnipresente mientras que las otras isoformas se expresan en un espectro más limitado de células y tejidos. Las isoformas aisladas de diferentes especies se conservan de manera evolutiva estrechamente y tienen identidades de secuencia del orden del 98 por ciento. Los TGF-beta-1 humanos, porcinos, de simio y bovinos maduros son idénticos y difieren del TGF-beta-1 murino en una sola posición de aminoácido. Los TGF-beta-1 humanos y de pollo también son idénticos.

25 Se ha notificado además que elementos de la familia de factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) son citocinas pleiotrópicas con papeles clave en la morfogénesis y el crecimiento tisulares (Ingman WV, Bioessays, 24 de oct de 2002:904-14). TGF-beta-1, TGF-beta-2 y TGF-beta-3 son abundantes en tejidos reproductores de mamíferos, en los que el desarrollo y la remodelación cíclica continúan tras el nacimiento y en la vida adulta. Se han identificado papeles potenciales para TGF-beta en el desarrollo de las gónadas y órganos sexuales secundarios, espermatogénesis y función ovárica, inmunorregulación del embarazo, implantación embrionaria y desarrollo placentario.

35 Rautava *et al.* en Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 38:378-388, abril de 2004, declaran que TGF-beta-2 e IL-10 parecen actuar de manera sinérgica favoreciendo TGF-beta-2 la producción de IL10.

40 La mastitis es una inflamación de la mama que a menudo se caracteriza por dolor a la palpación y eritema y a veces fiebre, y está relacionada con TGF-beta-2. Durante la mastitis, se abren las estrechas zonas de unión de las células alveolares de la mama, y este proceso va acompañado por un aumento en el sodio, las células inflamatorias y los mediadores inflamatorios e inmunológicos en la leche materna. La mastitis es habitualmente unilateral, y la mayor incidencia se da en las primeras semanas de la lactancia. En países industrializados, la mastitis se ha considerado generalmente un problema de baja morbilidad, ya que las mujeres afectadas a menudo se tratan por matronas y enfermeras. La mastitis parece ser más frecuente de lo que se creía previamente, puesto que grandes estudios longitudinales que han realizado un seguimiento de mujeres lactantes en Estados Unidos, Finlandia y Australia (Semba R., Annals of the New York Academy of Sciences. Noviembre de 2000: 918:156-62) sugieren que el 20-33% de las mujeres pueden desarrollar mastitis clínicamente evidente. Por tanto, el número de mujeres lactantes con mastitis subclínica es lógicamente incluso mayor.

50 Además, la mastitis se ha vinculado recientemente con una carga mayor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en la leche materna y un mayor riesgo de transmisión del VIH de madre a hijo. (Semba, R.D., N. Kumwenda, T.E. Taha, *et al.* 1999. Mastitis and immunological factors in breast milk of human immunodeficiency virus-infected women. J. Hum. Lact. 15(4): 301-306).

55 El TGF-beta-2 en la leche materna es principalmente de origen epitelial aunque se sintetice por muchas otras células, incluyendo células B y T. Por tanto, un aumento del nivel de TGF-beta-2 podría ser un mediador de o un efecto de una inflamación de la mama subclínica. Se dice que la razón de sodio y potasio en la leche materna (razón de Na/K) es un factor de predicción bien conocido de inflamación de la mama subclínica e infección.

60 Además, Kalliomaki *et al.* en J Allergy Clin Immunol. Diciembre de 1999: 104(6):1251-7, han sugerido que el TGF-beta en el calostro puede prevenir el desarrollo de enfermedades alérgicas durante la lactancia exclusiva y promover la producción de IgA específica en sujetos humanos.

65 Además, diversas ubicaciones del cuerpo de seres humanos y otros mamíferos están pobladas por muchas especies diferentes de bacterias, incluyendo varias especies diferentes de *Lactobacillus*. Tales bacterias coexisten muchas veces con su huésped dando efectos beneficiosos sinérgicos de diversos tipos, también conocidos hoy en día por ser diversos y dependientes de la cepa real de bacterias. Diferentes cepas de bacterias del ácido láctico, por ejemplo, *L. reuteri* SD2112, tienen antígenos específicos o bien en su superficie o bien liberados por la bacteria en el

tubo gastrointestinal de la madre. Los datos en Valeur *et al*, AEM, 70, 1176-1181 (2004) muestran que *L. reuteri* SD2112 ingerida puede afectar a los niveles de células T CD4+ cooperadoras en el íleon de un ser humano sano como un ejemplo. Tales observaciones también se han realizado en otras especies de mamíferos y aves indicando que esto puede ser un sistema de señalización fundamental entre al microflora intestinal y el huésped. Mediante el denominado eslabón enteromamario, se transportan activamente antígenos de las cepas activas a las regiones linfáticas, es decir, las placas de Peyer, por debajo del epitelio del tubo GI. Entonces se activan las células B específicas de antígeno tras lo cual migran desde el epitelio del tubo GI mediante la circulación hasta otras membranas mucosas en el cuerpo incluyendo las glándulas salivares y mamarias. La expresión de moléculas específicas en estas células se piensa que dirige su adhesión a estos tejidos. Una vez en la glándula mamaria, estas células inmunitarias dirigen entonces otros procesos para determinar los niveles de citocinas producidas localmente. Este tipo de señalización mediante el eslabón enteromamario se ha demostrado en la generación de IgA secretora en la leche materna y es probable que se aplique también a la producción de citocinas.

Anteriormente se ha sugerido (Laiho *et al*, Pediatric Research 53:642-647, 2003) que las asociaciones observadas entre factores nutricionales e inflamatorios en la leche materna muestran que puede ser posible influir en las propiedades inmunológicas de la leche materna mediante la intervención alimenticia de la madre. El mismo grupo señaló que las madres con enfermedades alérgicas tenían una concentración menor de TGF-beta-2 en la leche materna en comparación con las que no las tenían. Se detectó IL-10 en las manos, sólo a niveles y frecuencia bajos de manera natural en la leche materna, sin diferencia entre madres con enfermedad alérgica o no. Se sugirió que la protección frente a enfermedades alérgicas fue principalmente a través de la inducción de la tolerancia oral para TGF-beta-2 e IL-10, y que particularmente TGF-beta-2 de leche materna puede desempeñar un papel clave con respecto a la prevención de enfermedades alérgicas. Sin embargo, Weiner H. notificó en Microbes and Infection, volumen 3, tomo 11, septiembre de 2001, páginas 947-954 que debido a que las células T reguladoras generadas por antígenos orales se activan de manera específica de antígeno pero se inhiben de manera no específica de antígeno, median inhibición por vecindad cuando se encuentra con el autoantígeno alimentado en el órgano diana. Por tanto, puede usarse la tolerancia mucosa para tratar procesos inflamatorios que no son de naturaleza autoinmunitaria.

Se han usado diferentes especies de *Lactobacillus*, incluyendo *Lactobacillus reuteri*, en las denominadas formulaciones probióticas, lo que significa proporcionar a un animal, incluyendo seres humanos, microorganismos vivos y beneficiosos. Se da a conocer una formulación que contiene enterobacterias tales como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* y su método de preparación en la patente estadounidense 5.478.570. *Lactobacillus reuteri* es uno de los pobladores del tubo gastrointestinal de animales que se producen de manera natural, y se encuentra con frecuencia en los intestinos, y en ocasiones en el canal de parto, la leche materna y la boca de animales sanos, incluyendo seres humanos. Se sabe que tiene actividad antibacteriana. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.439.678, 5.458.875, 5.534.253, 5.837.238 y 5.849.289. Cuando se hacen crecer células de *L. reuteri* en condiciones anaerobias en presencia de glicerol, producen la sustancia antimicrobiana conocida como reuterina (β -hidroxi-propionaldehído).

También se ha notificado anteriormente el uso de bacterias del ácido láctico para prevenir y tratar alergias de diversos tipos, por ejemplo, pueden mencionarse las siguientes solicitudes de patente/patentes: EP 1239032 por Stadler *et al* respecto a nuevas cepas recombinantes, el documento WO 01/37865 por Clancy *et al* respecto a reducir la cantidad de IgE por lactobacilos.

Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar bacterias del ácido láctico seleccionadas y componentes de las mismas para mejorar la leche materna para alimentar a bebés. Más precisamente, un objeto de la invención es aumentar los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10 en la leche para reducir el riesgo de que el lactante desarrolle alergia al mismo tiempo que se reduce la causa y de ese modo la cantidad de TGF-beta-2 en la leche y el riesgo de que la madre lactante desarrolle mastitis.

Por tanto, un objeto de la invención es compensar los cambios negativos en la microflora administrando cepas de bacterias del ácido láctico seleccionadas específicamente a las madres antes y después de la lactancia.

Otro objeto de la invención es la selección, usando el método descrito en el presente documento o similar que distingue la influencia de citocinas específicas de las cepas de prueba en tipos de células relevantes, y el uso de tales cepas determinadas de bacterias del ácido láctico como componentes alimenticios para madres que estimula un aumento de la producción de IL10 en la leche materna al mismo tiempo que reduce el nivel de TGF-beta-2, lo que inicia un nivel menor de inflamación subclínica en las glándulas de leche materna y otros tejidos y, por tanto, un riesgo reducido de mastitis. Puede considerarse que la mastitis y la mastitis subclínica interfieren con la lactancia y, por tanto, impiden el beneficio que la leche materna proporciona al lactante (los lactobacilos seleccionados por el método de la presente invención pueden mejorar entonces la salud de las madres y permitirles dar el pecho durante un periodo más largo).

Otro objeto de la invención es proporcionar productos que contienen dichas cepas, mutantes, metabolitos o componentes de las mismas, incluyendo agentes para la administración a animales, incluyendo seres humanos.

Otros objetos y ventajas serán más claramente evidentes a partir de la siguiente divulgación y las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la invención

5 La invención en el presente documento comprende cepas de *Lactobacillus*, y componentes de las mismas, que se han seleccionado por su capacidad para mejorar la leche materna para alimentar a bebés, más precisamente para aumentar los niveles de la citocina antiinflamatoria IL10 en la leche para reducir el riesgo de que el lactante desarrolle alergia al mismo tiempo que se reduce la causa y, de ese modo, la cantidad de TGF-beta-2 en la leche, lo que significa una reducción del riesgo para la madre lactante de desarrollar mastitis y aumentar así la capacidad de dar el pecho y la protección global y el crecimiento óptimo que confiere al niño. Se da a conocer un método de selección de tales cepas de *Lactobacillus*. La invención también incluye un método novedoso para proteger *Lactobacillus* viables en un producto de aceite formulado, como medio de administración del componente activo.

15 Otros objetos y características de la invención serán más claramente evidentes a partir de la siguiente divulgación y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 es un diagrama de flujo de un procedimiento de fabricación que puede usarse para producir el producto de la invención.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

25 La presente invención proporciona un producto para mejorar la leche materna para alimentar a bebés, más precisamente para aumentar los niveles de la citocina antiinflamatoria IL10 en la leche y reducir el riesgo de que el lactante desarrolle alergias y reducir simultáneamente los factores causantes que activan la producción de la sustancia de señalización celular (TGF) y de ese modo, la cantidad de TGF-beta-2 en la leche, dando como resultado por tanto un riesgo reducido de que la madre lactante desarrolle mastitis. La disminución de TGF-beta-2 asociada con la invención se considera que es un efecto antiinflamatorio del consumo de bacterias del ácido láctico seleccionadas, lo que quiere decir que se reduce la incidencia de mastitis subclínica en el grupo lactante que recientemente había tenido una ingesta diaria de las bacterias. Un ejemplo de una cepa seleccionada por la invención en el presente documento es *L. reuteri* SD2112 (ATCC 55730).

35 En un ensayo clínico en la investigación que conduce a esta invención, sólo hubo tres factores en el análisis que estaban relacionados con el nivel de IL-10 en el calostro de las madres: a) tratamiento o no con bacterias del ácido láctico seleccionadas b) el número de niños dados a luz por la madre y c) el número de embarazos previos. Por tanto, cuanto mayor sea el número de bebés o embarazos que haya tenido una madre, más IL-10 está presente en su calostro. Suministrar bacterias del ácido láctico seleccionadas específicamente a la futura madre cuatro semanas antes del parto también tiene la capacidad de aumentar el nivel de IL-10 en el calostro sin requerirse embarazos anteriores.

40 También se sabe que el aumento de la expresión sistémica de IL-10, en algunas situaciones, previene la diabetes tipo 1, por tanto, las cepas seleccionadas según esta invención también podrían usarse con este fin.

45 En el método de selección usado en el presente documento, las mejores cepas para inducir IL10 en la leche materna, y que muestran un nivel reducido de TGF-beta-2, se seleccionan usando un modelo de ratón establecido y métodos analíticos tradicionales. También pueden usarse otros métodos similares para detectar la producción de citocinas en la leche. Los detalles de esto se entenderán más claramente a partir de los ejemplos. El producto de la invención contiene preferiblemente células vivas de la(s) cepa(s) seleccionada(s); sin embargo, si partes o metabolitos aislados de tales células son responsables de la actividad de las células vivas de la(s) cepa(s), los productos de la invención pueden incluir tales partes o metabolitos además de o en vez de las células vivas. El producto de la invención puede ser cualquier producto para el consumo por la mujer, tal como un producto de gotas de aceite, productos alimenticios, comprimido, cápsula, sobres de polvo, y similares. Los productos que por sí mismos se prestan particularmente para su uso en la invención incluyen una gota de aceite (tal como en el ejemplo 3) que ayudará a mantener el principio activo estable durante un periodo de tiempo prolongado. Se han usado células de *Lactobacillus* en formulaciones de aceite para una estabilidad mejorada de las bacterias, véase, por ejemplo, la patente estadounidense 4518696 por Gehrman *et al.* Pero ninguna de las formulaciones de bacterias del ácido láctico existentes en aceites y grasas que se han encontrado contiene la importante etapa de secar el aceite por medio de vacío antes de la formulación para obtener una estabilidad aumentada de los cultivos de bacterias, tal como se expone en los ejemplos en el presente documento.

60 La concentración de células de *Lactobacillus* seleccionadas necesaria para la eficacia de un producto de la invención depende del tipo de alimento y de la cantidad de alimento que va a ingerirse (o del tiempo de uso en la boca de un producto de tratamiento dental que no es un alimento), pero es habitualmente preferible tener un equivalente de aproximadamente 10^5 - 10^8 UFC (unidades formadoras de colonias) o más por ingesta diaria de un

producto. Son posibles cantidades de hasta aproximadamente 10^{10} - 10^{11} UFC y pueden usarse para aumentar la eficacia sin afectar negativamente a las características organolépticas del producto (su sabor u olor). Cuando el producto es un yogur u otro producto de fermentación del ácido láctico, la(s) cepa(s) de fermentación del ácido láctico usadas para producir el producto serían preferiblemente cultivos convencionales (por ejemplo, en el yogur, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*). Es importante que la cepa activa seleccionada que tiene los efectos de citocina deseados según la invención en el presente documento sea compatible con cualquier cultivo convencional usado en el producto, de manera que las propiedades importantes de cada cepa usada no se anulen por el uso de la(s) otra(s) cepa(s). Por supuesto, esto puede determinarse fácilmente mediante pruebas de examen conocidas en la técnica. Las cepas usadas para la invención en el presente documento pueden añadirse o bien antes o bien después de la fermentación del producto a un nivel equivalente de aproximadamente 10^6 - 10^8 UFC por ración diaria de yogur o más tal como se comentó anteriormente

Preferiblemente, el producto de la invención no contiene otros componentes antibacterianos, al menos ninguno que inhiba o inactive la(s) cepa(s) de *Lactobacillus* seleccionada(s), o metabolitos o componentes de las mismas, o que interfiera con la actividad.

La(s) cepa(s) de *Lactobacillus*, o metabolitos o componentes de las mismas, pueden ser un aditivo mezclado con los componentes por medios conocidos en la técnica para la formulación de productos de ese tipo. Cuando se usan células, y si la preparación del alimento seleccionado u otro producto de la invención requieren una etapa de calentamiento, la(s) cepa(s) de *Lactobacillus* debe(n) añadirse después de calentar. Una vez que las células de *Lactobacillus* seleccionadas están en el producto, se prefiere no calentar el producto hasta 60-70 grados C o superior durante un periodo de tiempo prolongado.

Las características de la presente invención se entenderán más claramente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que no han de interpretarse como limitativos de la invención.

Ejemplo 1. Método de selección de cepas

La selección de las cepas de *Lactobacillus* que van a usarse según esta invención, puede realizarse de la siguiente manera por etapas:

Evaluación de la estimulación de la producción de IL-10 y la reducción de TGF-beta-2 leche materna humana por células de cepas de *Lactobacillus* para la selección de cepas

Este es un ejemplo del método de selección; pueden realizarse determinadas variaciones y alteraciones de este método por un experto en la técnica sin desviarse de la invención en el presente documento.

Materiales y métodos

Animales: se adquieren cincuenta y un ratones BALB/c libres de gérmenes (machos y hembras) de la Universidad de Wisconsin, EE.UU. Se envían los ratones en transportadores con película de plástico estériles. Se transfieren quince ratones a cada uno de 3 aisladores (aisladores n.º 2, 3 y 4). Se colocan dos jaulas que contienen cada una 2 machos y 4 hembras en el aislador n.º 1 (criador).

Manipulación de los animales

Se mantienen los ratones en aisladores con película flexible estériles (Class Biologically Clean, Ltd, Madison, WI, EE.UU.). Se esterilizan los aisladores con una disolución de ácido peracético al 2% (FMC Corporation, Filadelfia, PA, EE.UU.) que contiene Naconal al 0,1% (Stepan Co., Rocksport, IL, EE.UU.). Se alojan cinco de 6 ratones en jaulas de poliestireno esterilizadas con ácido peracético con tapas de alambre de acero inoxidable. Se colocan los ratones del mismo sexo en cada jaula. Se alimenta a los ratones con comida para roedores Agway 3500 esterilizable en autoclave (Agway, Granville, Creedmoore, NC, EE.UU.). Se esterilizan en autoclave alimentos, agua y lechos. Se esterilizan en autoclave los alimentos y los lechos dentro de cilindros de acero inoxidable y luego se transfieren de manera aséptica a aisladores. Se esterilizan en autoclave frascos con agua del grifo y luego se esterilizan con ácido peracético cuando se colocan en aisladores. Todos los ratones recibieron alimentos y agua a voluntad. Se comprueban diariamente los niveles de alimento y agua. Se cambian los lechos una vez a la semana. Se mantienen los animales en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se comprueban diariamente la temperatura ambiente y la humedad relativa.

Bacterias

Se identifican bacterias del ácido láctico que van a someterse a prueba y se caracterizan mediante técnicas bioquímicas y de biología molecular. En primer lugar, se hacen crecer los lactobacilos en 10 ml de medio Man-Rogosa-Sharp (MRS) (BBL, Cockeysville, MD), se incuban durante 18 h a 37°C y luego se transfieren a 90 ml de MRS, se incuban a 37°C durante 18 h y se transfieren a 1000 ml de MRS. Tras 18 h de incubación a 37°C, se centrifugan los cultivos a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada (SORVALL RC2-B, SORVALL,

Norwalk, CN, EE.UU.), se descarta el sobrenadante y se lava dos veces el sedimento con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril a 3000 rpm durante 10 min. Se resuspende el sedimento de cada cepa en 30 ml de PBS. Se colocan los cultivos en crioviales de 1,2 ml y se almacenan a -70°C hasta que se usan. Antes de ofrecer las bacterias a los ratones, se comprueban la pureza y la concentración de los cultivos. Se cultivan diluciones 1/10 en serie de las suspensiones de lactobacilos en placas de medio MRS con el 1,5% de agar y se incuban en frascos anaerobios (GasPaK:BBL, Cockeysville, MD, EE.UU.) que contienen generadores anaerobios (Anaero Gen:Oxoid Ltd., Wake Road, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra, R.U.) durante 48 h a 37°C. Se comprueban los cultivos para determinar su morfología de colonias y producción de reuterina.

10 Tratamientos de prueba (en este ejemplo)

Control.

Cepa: *Lactobacillus reuteri* SD2112, ATCC 55730.

15 Cepa: *Lactobacillus* 4000

Cepa: *Lactobacillus* 4020

20 Determinación de colonización de *Lactobacillus*

Un día después de que los ratones se coloquen en los aisladores, se toman muestras fecales de ratones en cada jaula para someter a prueba la ausencia de microorganismos. Se privan los ratones de agua desde las 11:00 am hasta las 7:00 pm. Después de este periodo de tiempo, se añaden 1,2 ml de una suspensión de bacterias del ácido láctico a cada frasco que contiene 200 ml de agua y se ofrece a los ratones. Los ratones en el aislador n.º 2 reciben *L. reuteri* SD2112. La suspensión añadida al agua contiene $2,0 \times 10^{10}$ ufc/ml de *L. reuteri* SD2112. Los ratones en el aislador n.º 4 reciben la cepa *Lactobacillus* 4000 y los ratones en el aislador n.º 5 reciben la cepa *Lactobacillus* 4020. La suspensión de bacterias del ácido láctico añadida a cada frasco de agua contiene $3,0 \times 10^{10}$ ufc/ml. Los ratones en el aislador n.º 3 reciben únicamente agua (control). Se toman semanalmente muestras fecales (10 microgránulos) de ratones (grupo en jaula) en cada aislador para someter a prueba la colonización de bacterias del ácido láctico y la posible contaminación con otros microorganismos.

“Convencionalización” con microflora de Schaedler alterada

35 Sesenta días después de que empezara la colonización con cepas de prueba, los ratones se “convencionalizan” con microflora de Schaedler alterada. Se adquieren ratones C3H que tienen microflora Schaedler de Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY, EE.UU.). Se colocan dos ratones en cada aislador y se toman muestras de heces inmediatamente para someter a prueba la presencia de la cepa de prueba. Se privan de agua los ratones de control y los ratones colonizados con cepas de prueba durante la noche. Al siguiente día, se colocan 10 microgránulos de heces de ratones C3H en cada frasco de agua potable, se suspenden en agua y se ofrece a los ratones. Este procedimiento se continúa durante 3 días consecutivos. Se obtienen heces de ratones BALB/c y C3H una vez a la semana durante 1 mes para comprobar la colonización de la microflora de Schaedler alterada y la presencia de cepas de prueba.

45 Evaluaciones

Cuarenta y cinco días después de la monocolonización con cepas de prueba, y 30 días después de la “convencionalización” se sacrifican cinco ratones de cada grupo de tratamiento y se toman muestras de los bazo de los animales para determinar el aislamiento de linfocitos T y la determinación de citocinas.

50 Preparación de células del bazo: se extirpan los bazo de manera aséptica y se colocan en PBS frío + albúmina sérica bovina al 0,5% (BSA) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.) + azida de sodio (NaN₃) al 0,1% (Sigma). Se prepara una única suspensión celular de cada bazo perfundiéndola con 5 ml de medio RPMI-1640 (Sigma) + 0,1 mg/ml de gentamicina (Sigma). Se transfiere la suspensión celular a tubos cónicos estériles de 15 ml y se centrifuga a 2000 rpm durante 10 min en una centrífuga refrigerada. Se decanta el sobrenadante y se lisan los glóbulos rojos de cada tubo resuspendiendo las células en 0,5 ml de PBS 1X, añadiendo después 9 ml de agua destilada, mezclando bien y añadiendo finalmente de manera rápida 1 ml de PBS 10X y mezclando bien. Se centrifuga la suspensión tal como antes, luego se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 5 ml de medio completo RPMI-1640. Se comprueba una muestra de la suspensión bajo el microscopio y si están presentes partículas distintas de células, se filtra la suspensión a través de un tejido de nailon estéril y se centrifuga de nuevo. Se resuspende el sedimento en 5 ml de medio RPMI-1640 completo, se lava dos veces y finalmente se resuspende en 5 ml de medio completo. Se determina la viabilidad celular mediante exclusión con azul tripano (Sigma). Se diluyen veinte µl de suspensión celular en 380 µl de disolución de azul tripano al 0,1% (dilución 1:20) y se cuentan en un hematocitómetro. Se ajusta la concentración de la suspensión celular a $1,0 \times 10^6$ células/ml en RPMI-1640 completo.

Cultivo celular: Se cultivan las células en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos estériles (Fisherbrand, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE.UU.) con medio completo RPMI-1640 en ausencia (sin estimular) y en presencia de agentes inductores tales como concavalina A (5 µg/ml), LPS (1 µg/ml) de *Salmonella typhimurium*, 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA; 10 ng/ml), ionomicina (I; 0,5 µg/ml), y *L. reuteri* inactivada por calor (4,5 mg de proteína/ml). Se añaden cien µl de suspensión celular que contiene $1,0 \times 10^5$ células y cincuenta µl de *L. reuteri* inactivada por calor (4,5 mg de proteína/ml) a cada pocillo. Se realiza cada conjunto con 5 repeticiones. Se incuban los cultivos celulares en atmósfera con 5% de CO₂ durante 48 h a 37°C con el mitógeno y durante 96 h con *L. reuteri*. Se recogen los sobrenadantes de los 5 pocillos, se agrupan y se almacenan a -70°C hasta que se usan para ensayos de citocinas.

Cuantificación de citocinas: se miden las citocinas (IL-10, TGF-beta-2) en los sobrenadantes mediante ELISA usando el kit Quantikine™ M murino (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

Resultados

Las citocinas son proteínas del sistema inmunitario que son modificadores de la respuesta biológica. Coordinan interacciones del sistema inmunitario de células T y anticuerpos, y amplifican la reactividad inmunitaria. Las citocinas incluyen monocinas sintetizadas por macrófagos y linfocinas producidas por linfocitos T activados y linfocitos citotóxicos naturales (NK).

La cepa de prueba *L. reuteri* SD2112 muestra una concentración mayor ($P < 0,05$) de IL-10 que células de la cepa 4000, 4020 o los ratones de control. Además, los niveles de TGF-beta-2 son mayores para la cepa SD2112. Esta cepa se selecciona según la presente invención.

b. Confirmación de la estimulación de producción de IL-10 y reducción de TGF-beta-2 en leche materna humana por células de cepas de *Lactobacillus*

Este ejemplo confirma que la cepa seleccionada da el efecto deseado *in vivo*. Se somete a prueba *Lactobacillus reuteri*, ATCC55730 (disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, EE.UU.). La cepa de *Lactobacillus* de prueba se hace crecer en caldo de MRS (Difco), y se recoge durante la fase de crecimiento exponencial mediante centrifugación a 1000 x g, se lava dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 6,8) y se resuspende en el mismo tampón. Después de esto, se formula el cultivo para dar un producto de aceite en gotas, siguiendo los métodos en el ejemplo 3 a continuación.

Este estudio es una investigación de doble ciego, controlada por placebo que confirma el potencial de las bacterias del ácido láctico seleccionadas en alergia, llevado a cabo en los departamentos de Pediatría en hospitales de los municipios de Jönköping, Motala y Norrköping y el Hospital Universitario en Linköping, Suecia.

Se seleccionaron aleatoriamente mujeres embarazadas de familias con antecedentes de enfermedad alérgica para recibir por vía oral *Lactobacillus reuteri* SD2112, ATCC 55730, dosis diaria 1×10^8 UFC o placebo durante las cuatro semanas antes del término. Se confirmaron los antecedentes de enfermedad alérgica mediante una entrevista por teléfono por una enfermera de investigación alérgica experimentada. En total, se incluyeron 232 familias en el ensayo y se aleatorizaron por igual entre la rama experimental y la de placebo, desde enero de 2001 hasta abril de 2003.

Se evaluó el cumplimiento recogiendo todos los frascos usados del producto de estudio y luego estimando lo que quedaba en los mismos.

Métodos

El presente estudio incluye calostro, obtenido dentro de los 3 primeros días tras dar a luz, y leche madura, obtenida un mes después de dar a luz, de 109 de las madres. Las muestras de leche se recogieron usando un sacaleches manual en tubos de plástico estériles y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Después de descongelar, se centrifugaron las muestras de leche para retirar grasa y compartimentos celulares (Böttcher, 2000). Se analizó el suero restante inmediatamente con respecto al contenido de IL-10 y el resto del suero se almacenó en alícuotas a -70°C y después se analizó para dar TNF-α, IL-4, TGF-beta-1, TGF-beta-2, CD14 soluble (sCD14), IgA total, IgA (IgAs) secretora y sodio y potasio.

Se analizaron los niveles de TGF-beta-1, TGF-beta-2 y CD14s (CD14 soluble) con kits para ELISA comerciales (R&D Systems, Abingdon, R.U.) según las recomendaciones del fabricante. Los análisis de TGF-beta-1 y TGF-beta-2 se realizaron después del tratamiento con ácido para preactivar TGF-beta latente, tal como se describió anteriormente (Böttcher 2000). Se determinaron los niveles de IL-10 y TNF-α con kits de reactivos para ELISA comerciales (conjunto de reactivo CLB PeliPair, Ámsterdam, Los Países Bajos) según el protocolo del fabricante. El

límite inferior de detección fue de 62,5 pg/ml para TGF-beta-1 y TGF-beta-2, 250 pg/ml para CD14s, 2,3 pg/ml para IL-10 y 7,8 pg/ml para TNF- α .

Se analizaron las IgA e IgAs totales con ELISA tal como se describió anteriormente (Böttcher 2002). El límite inferior de detección, fue de 31,2 ng/ml para ambos ensayos. Se midieron los niveles de sodio y potasio en el Departamento de Química Clínica en el Hospital Universitario de Linköping según rutinas convencionales (electrodos selectivos de iones). Se analizaron los niveles de IgE en suero con respecto un panel de alérgenos por inhalación con UniCap® Pharmacia CAP Sistema™ Phadiatop® (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suecia).

10 Análisis estadístico

Se calculó el tamaño del grupo de estudio asumiendo el 80% de potencia para detectar una verdadera diferencia en las manifestaciones clínicas en el grupo con *L. reuteri* en comparación con el grupo con placebo. El cálculo se basa en la suposición de que se producen manifestaciones clínicas de alergia o eccema en al menos el 40% de los sujetos en el grupo con placebo y pueden reducirse a la mitad en el grupo experimental. Los sujetos necesarios fueron 91 sujetos que podían evaluarse por grupo y se supuso que la frecuencia de abandono era del 25%. Una compañía externa realizó una lista de aleatorización y se estratificó por centro en un tamaño de bloque de cuatro. Se estimó que el número total de sujetos que era necesario incluir basándose en el cálculo anterior, incluyendo la frecuencia de abandono esperada y el tamaño de bloque, era de 116 mujeres y sus hijos por grupo.

20 Consideraciones éticas

Según la Declaración de Helsinki sobre investigación médica con sujetos humanos, los participantes recibieron una información por escrito y firmaron un consentimiento informado. La cepa de prueba *L. reuteri* SD2112 en aceite se consideró bien documentada y un producto seguro para tanto niños como adultos, y por consiguiente, no se consideró un problema ético incluir a mujeres embarazadas y a sus hijos.

Los procedimientos del estudio con diferentes pruebas también se consideraron un problema minoritario en cuanto al hecho de que una gran proporción de esta población de riesgo desarrollaría enfermedad alérgica y se sometería a procedimientos de estudio de alergia. El protocolo se aprobó por el Comité de Ética en el Hospital Universitario de Linköping.

30 Resultados

35 En el estudio, se examinó el efecto sobre la leche materna cuando mujeres embarazadas tomaban la cepa *Lactobacillus reuteri* SD2112 por vía oral durante 4 semanas antes de dar a luz.

Los perfiles maternos que comparan los dos grupos fueron similares. El número de semanas cuando las madres tenían una ingesta diaria del producto del estudio no difirieron entre los dos grupos en lo que respecta a la lactancia exclusiva en un mes. Las interrupciones en los dos grupos, hasta un mes de edad, se debieron principalmente a revisión a la unidad de neonatos (uno de los criterios de exclusión). No se observaron diferencias entre los dos grupos.

45 En el grupo de la cepa de prueba de *L. reuteri*, se cambió el perfil de citocinas en la leche materna por un aumento del nivel de la citocina antiinflamatoria IL-10 en calostro (mediana de 6,61 pg/ml [intervalo 1,15 -150]), que en muestras de las madres en el grupo con placebo (4,78 pg/ml [1,15 -150]); $p = 0,046$. Mientras, se observó una disminución en el nivel de TGF-beta-2 en el grupo con *L. reuteri* SD2112. TGF-beta-2 fue significativamente menor en el grupo con *L. reuteri* (mediana de 674 pg/ml [102,5 -2800] frente a 965 pg/ml [211,7 -2800]) que en el grupo con placebo; $p = 0,020$. Los niveles de los otros parámetros fueron similares en los dos grupos.

50 La leche materna obtenida 4 semanas tras dar a luz y la interrupción de la ingesta diaria de probióticos, no mostraron diferencia en comparación con el grupo con placebo.

55 Ejemplo 3. Fabricación de productos que contienen la cepa seleccionada

En este ejemplo, se fabrica un producto denominado "gotas Reuteri". El producto es una formulación a base de aceite que contiene *L. reuteri* SD2112 producida para una buena estabilidad y vida útil. La característica única del procedimiento de producción es una etapa de secado del aceite para retirar la mayor parte del agua en el aceite.

60 El aceite usado en la invención en el presente documento es un aceite vegetal comestible puro, preferiblemente aceite de girasol. Aunque no se esperaría que un aceite tal como un aceite de girasol puro contuviera nada de agua, un efecto inesperado de la etapa de procesamiento de secado del aceite colocándolo a vacío es una estabilidad significativamente aumentada de los lactobacilos en la formulación. Por tanto, el aceite usado en la invención debe ser un aceite del cual es posible retirar agua. Aunque se conocía previamente que la estabilidad de tales cultivos se correlacionaba estrechamente con la actividad del agua de la formulación, no se conocía el secar un aceite a vacío para la estabilización de lactobacilos.

Descripción del procedimiento de fabricación.

5 Se muestra un diagrama de flujo del procedimiento de fabricación preferido en la figura 1. A continuación se facilitan los detalles de un posible procedimiento de este tipo que puede usarse en la invención en el presente documento.

Mezclado de los ingredientes.

10 1 Mezclado del triglicérido de cadena media (por ejemplo, Akomed R, (Karlshamns AB, Karlshamn, Suecia) y aceite de girasol (por ejemplo, Akosun, Karlshamns) con dióxido de silicio, Cab-o-sil M5P, M5P, Cabot) en una máquina/tanque de mezclado Bolz (Alfred BOLZ Apparatebau GmbH, Wangen im Allgäu, Alemania)

15 2 Homogenización. Se conectan una bomba Sine y un dispositivo dispax (Sine Pump, Arvada, Colorado) al mezclador Bolz y se homogeneiza la mezcla.

3 Secado a vacío. La mezcla se seca a un vacío de 10 mBar en el tanque Bolz, durante 12 horas.

20 4 Adición de *Lactobacillus reuteri*. Se trasladan aproximadamente 20 kg de mezcla de aceite secado a un recipiente de acero inoxidable de 50 litros. Se añade polvo de *L. reuteri* (preferiblemente liofilizado; la cantidad de *L. reuteri* usada variará según la cantidad deseada en el aceite, pero un ejemplo sería añadir 0,2 kg de cultivo que tiene 10^{11} UFC por g). Se mezcla lentamente hasta que es homogéneo.

5 Mezclado. La premezcla con *L. reuteri* se lleva de nuevo al mezclador Bolz.

25 6 Descarga. La suspensión se descarga a un recipiente de vidrio de 200 litros, y se cubre con nitrógeno. La suspensión se mantiene en el recipiente hasta el llenado en frascos.

30 Aunque se han expuesto determinadas realizaciones representativas en el presente documento, los expertos en la técnica apreciarán rápidamente que pueden realizarse modificaciones sin apartarse del alcance de la invención.

35 En otro aspecto, se proporciona método para seleccionar una cepa bacteriana del ácido láctico para su administración a una mujer para mejorar la leche materna de la mujer para alimentar a un bebé, que comprende seleccionar un cepa de *Lactobacillus*, habiéndose encontrado que la administración de tal cepa de *Lactobacillus* aumenta los niveles de IL-10 y disminuye el nivel de TGF-beta-2 en la leche materna cuando se administra a la mujer.

40 También se proporciona un método para aumentar la actividad antiinflamatoria en la leche materna de una mujer, que comprende administrar a la mujer células de la cepa bacteriana del ácido láctico seleccionada mediante el método anterior.

45 También se proporciona un método para aumentar IL-10 en la leche materna de una mujer al mismo tiempo que se reducen los niveles de TGF-beta-2, que comprende administrar a la mujer células de la cepa bacteriana del ácido láctico seleccionada mediante el método anterior. En dicho método, las células de la cepa bacteriana del ácido láctico pueden administrarse a la mujer antes del nacimiento de un niño. En dicho método, las células de la cepa bacteriana del ácido láctico pueden administrarse a la mujer después del nacimiento de un niño.

También se proporciona un producto que contiene células de una cepa bacteriana del ácido láctico seleccionada mediante el método descrito anteriormente.

50 El producto puede comprender además un aceite vegetal comestible.

El producto puede comprender un aceite vegetal comestible en el que el aceite vegetal comestible es aceite de girasol.

55 El aceite del producto descrito anteriormente puede prepararse mediante una etapa de secado a vacío.

También se proporciona un producto de aceite que permite un aumento de la supervivencia de cultivos microbianos secados, en el que el producto se prepara mediante una etapa de secado a vacío del aceite.

60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Producto de aceite que permite aumentar la supervivencia de cultivos microbianos secados, en el que el producto se prepara mediante una etapa de secado a vacío del aceite, en el que dicho aceite es un aceite del cual es posible retirar agua y en el que dicho producto comprende bacterias *Lactobacillus* viables.
2. Producto de aceite según la reivindicación 1, en el que el aceite es un aceite vegetal comestible puro.
- 10 3. Producto de aceite según la reivindicación 2, en el que el aceite es aceite de girasol.
4. Producto de aceite según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las bacterias *Lactobacillus* son bacterias *Lactobacillus reuteri*.
- 15 5. Producto de aceite según la reivindicación 4, en el que las bacterias son *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730.
6. Producto de aceite según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho producto comprende además un aceite de triglicérido de cadena media.
- 20 7. Producto de aceite según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho producto comprende además un dióxido de silicio.

Figura 1

