

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 006**

51 Int. Cl.:

A61K 31/201 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2006 PCT/US2006/010415**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2006 WO06113034**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2006 E 06739275 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 1868596**

54 Título: **Uso de Lactobacillus rhamnosus GG en combinación con un ácido graso poliinsaturado de cadena larga para el tratamiento, prevención o reducción de la inflamación sistémica en un lactante alimentado con leche maternizada**

30 Prioridad:

15.04.2005 US 106794

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

17.01.2020

73 Titular/es:

**MJN U.S. HOLDINGS LLC (100.0%)
225 North Canal Street, 25th Floor
Chicago, Illinois 60606, US**

72 Inventor/es:

**MCMAHON, ROBERT J.;
HERZ, UDO y
NEU, JOSEF**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 006 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

Uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG en combinación con un ácido graso poliinsaturado de cadena larga para el tratamiento, prevención o reducción de la inflamación sistémica en un lactante alimentado con leche maternizada

Antecedentes de la invención

5 (1) Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a un uso de un probiótico en combinación con al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención, o reducción de la inflamación sistémica en un lactante alimentado con leche maternizada.

(2) Descripción de la técnica afín

10 La respuesta inflamatoria es un intento del cuerpo para restablecer y mantener la homeostasis después de la invasión por un agente infeccioso, exposición a antígeno, o daño físico, químico o traumático. La inflamación localizada está contenida en una región específica y puede exhibir síntomas variables, que incluyen enrojecimiento, tumefacción, calor y dolor.

15 Si bien la respuesta inflamatoria está considerada generalmente como una respuesta saludable a la lesión, el sistema inmune puede presentar una respuesta fisiológica indeseable si no está regulado adecuadamente. En estas situaciones, el sistema inmune que protege normalmente el cuerpo causa daño a su propio tejido por tratar el tejido sano como si el mismo estuviera infectado o fuese algo anormal. Alternativamente, si existe una lesión, la respuesta inflamatoria puede ser desproporcionada para la amenaza de que se trata. Esta respuesta inflamatoria puede causar más daño al cuerpo que el que podría haber producido el agente propiamente dicho.

20 Se ha encontrado que la respuesta inflamatoria consiste en parte en una expresión aumentada de citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. Las citocinas son proteínas biológicamente activas de peso molecular bajo implicadas en la coordinación de las respuestas inmunológicas e inflamatorias y la comunicación entre poblaciones específicas de células inmunes. Cierta número de tales tipos de células producen citocinas, con inclusión de neutrófilos, monocitos, y linfocitos como las fuentes principales durante las reacciones inflamatorias debido a sus
25 grandes números en el sitio de la lesión.

Existen múltiples mecanismos por los cuales las citocinas generadas en sitios inflamatorios influyen en la respuesta inflamatoria. No obstante, si una respuesta pro-inflamatoria no se ve contrarrestada con éxito por citocinas anti-inflamatorias, puede ocurrir inflamación sistémica incontrolada.

30 En contraste con la inflamación localizada, la inflamación sistémica está extendida por todo el cuerpo. Este tipo de inflamación puede incluir inflamación localizada en sitios específicos, pero puede estar asociado también con síntomas generales "similares a la gripe", que incluyen fiebre, escalofríos, fatiga o pérdida de energía, cefalalgias, pérdida de apetito, y rigidez muscular. La inflamación sistémica puede conducir a degradación, catabolismo e hipermetabolismo de proteínas. Como consecuencia, la estructura y función de órganos esenciales, tales como músculos, corazón, sistema inmune e hígado pueden verse comprometidas y pueden contribuir a fallo multiorgánico y mortalidad.
35 Jeschke, *et al.*, *Insulin Attenuates the Systemic Inflammatory Response to Thermal Trauma*, *Mol. Med.* 8(8):443-450 (2002). Aunque se ha logrado un progreso enorme en la comprensión de los mecanismos de la inflamación sistémica, la tasa de mortalidad debida a este trastorno sigue siendo inaceptablemente alta.

A menudo, el que la respuesta de citocinas sea pro- o anti-inflamatoria depende del balance de microorganismos individuales que colonizan el lumen intestinal en cualquier momento particular. Es bien conocido que la superficie mucosal del tracto intestinal está colonizada por un conjunto enormemente grande, complejo y dinámico de microorganismos. La composición de la microflora intestinal varía a lo largo del tracto digestivo, así como en micro-habitats diferentes, tales como la capa de moco epitelial, la capa profunda de moco de las criptas, y la superficie de las células mucosas epiteliales. La colonización específica depende de factores externos e internos, que incluyen moléculas luminalmente disponibles, calidad del moco e interacciones hospedador-microbio y microbio-microbio.
40 Murch, S.H., *Toll of Allergy Reduced by Probiotics*, *Lancet*, 357:1057-1059 (2001).

Estos microorganismos, que constituyen la microflora intestinal, están implicados activamente con la respuesta inmune. Los mismos interactúan con el epitelio en condiciones de relación beneficiosa mutua para ambos socios (simbiosis) o en condiciones de beneficio para un socio, sin ser perjudiciales para el otro. Hooper, *et al.*, *How Host-Microbial Interactions Shape the Nutrient Environment of the Mammalian Intestine*, *Annu. Rev. Nutr.* 22:283-307 (2002). De hecho, están apareciendo evidencias considerables que muestran una fuerte interacción o "réplica" entre la microflora intestinal y la población diversa de células en la mucosa intestinal. Bourlioux, *et al.*, *The Intestine and its Microflora are Partners for the Protection of the Host: Report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine"*, celebrado en París, 14 de junio 2002, *Am. J. Clin. Nutr.* 78:675 (2003); Hooper, L.V. & Gordon, J.I., *Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut*, *Sci.* 292:1115 (2001);
45 Haller, *et al.*, *Non- Pathogenic Bacteria Elicit a Differential Cytokine Response by Intestinal Epithelial Cell/Leucocyte Co-Cultures*, *GUT* 47:79 (2000); Walker, W.A., *Role of Nutrients and Bacterial Colonization in the*

Development of Intestinal Host Defense, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30:S2 (2000). Adicionalmente, se ha demostrado que la microflora intestinal provoca respuestas inmunes específicas a nivel tanto local como sistémico en adultos. Isolauri, E., et al., *Probiotics: Effects on Immunity*, Am. J. Clin. Nutr. 73:444S-50S (2001).

5 Es bien sabido que la microflora intestinal en los lactantes está mucho menos desarrollada que la de un adulto. Mientras que la microflora del adulto humano consiste en más de 10^{13} microorganismos y cerca de 500 especies, algunas de las cuales son dañinas y otras beneficiosas, la microflora de un lactante contiene sólo una fracción de tales microorganismos, tanto en número absoluto como en diversidad de especies. Los lactantes nacen con un intestino estéril, pero adquieren flora intestinal del canal natal, su ambiente inicial, la cual ingieren. Dado que la población de la microflora intestinal es muy inestable en la vida neonatal temprana, es a menudo difícil para el intestino del lactante mantener el balance delicado entre bacterias nocivas y beneficiosas, reduciendo así la capacidad del sistema inmune para funcionar normalmente.

10 Para los lactantes alimentados con leche maternizada es especialmente difícil mantener este balance debido a las diferencias entre las especies bacterianas en el intestino de un lactante alimentado con leche maternizada y un lactante amamantado. Las heces de los lactantes amamantados contienen predominantemente *Bifidobacterium*, con *Streptococcus* y *Lactobacillus* como contribuyentes menos comunes. En contraste, la microflora de los lactantes alimentados con leche maternizada es más diversa, conteniendo *Bifidobacterium* y *Bacteroides* así como las especies más patógenas, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, y *Clostridia*. Las diversas especies de *Bifidobacterium* en las heces de los lactantes amamantados y alimentados con leche maternizada difieren también. Se han propuesto una diversidad de factores como la causa de la diferente flora fecal de los lactantes amamantados y alimentados con leche maternizada, que incluyen el menor contenido y la diferente composición de proteínas en la leche humana, un contenido más bajo de fósforo en la leche humana, la gran diversidad de oligosacáridos en la leche humana, y numerosos mediadores humorales y celulares de función inmunológica en la leche de mama. 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).

15 Dado que la microflora de los lactantes alimentados con leche maternizada es tan inestable y la microflora intestinal participa notablemente en la estimulación de la inmunidad intestinal, los lactantes alimentados con leche maternizada son más propensos a sufrir enfermedades inflamatorias. Muchas de las principales enfermedades que afectan a los lactantes, que incluyen enfermedad pulmonar crónica, leucomalacia periventricular, meningitis neonatal, hepatitis neonatal, sepsis, y enterocolitis necrotizante son de naturaleza inflamatoria. Dependiendo de la enfermedad particular, la inflamación acompañante puede ocurrir en un órgano específico, tal como el pulmón, cerebro, hígado o intestino, o la inflamación puede ser de naturaleza realmente sistémica.

20 Por ejemplo, la enfermedad pulmonar crónica causa que los tejidos internos de los pulmones lleguen a inflamarse mientras que la meningitis neonatal implica inflamación de los revestimientos internos del cerebro y la médula espinal. La leucomalacia periventricular está causada por daño inflamatorio al área periventricular en el cerebro en desarrollo. La enterocolitis necrotizante causa inflamación en el intestino que puede dar como resultado la destrucción parcial o total del intestino, y la hepatitis neonatal implica una inflamación del hígado que ocurre en la infancia temprana. La sepsis, conocida también como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, es una enfermedad grave causada por una infección abrumadora del torrente sanguíneo por bacterias productoras de toxinas, donde la presencia de patógenos en el torrente sanguíneo provoca una respuesta inflamatoria a lo largo de todo el cuerpo.

25 Los lactantes prematuros y críticamente enfermos representan también un riesgo grave en términos del desarrollo de la inmunidad intestinal y prevención de la inflamación sistémica. Los lactantes prematuros o críticamente enfermos se transfieren inmediatamente a menudo a incubadoras estériles, donde aquéllos permanecen sin exposición a las poblaciones bacterianas a las que se vería expuesto normalmente un lactante recién nacido sano. Esto puede retardar o empeorar el proceso de colonización natural. Estos lactantes se tratan también a menudo con antibióticos de amplio espectro, que destruyen las bacterias comensales que intentan colonizar el tracto intestinal del lactante. Adicionalmente, estos lactantes se alimentan a menudo por medio de una leche maternizada, en lugar de la leche materna. Cada uno de estos factores puede hacer que la microflora intestinal del lactante se desarrolle inadecuadamente, causando o precipitando así una inflamación sistémica amenazante para la vida.

30 Una forma de estimular una colonización del intestino con microorganismos beneficiosos en los lactantes alimentados con leche maternizada es mediante la administración de bacterias probióticas. Las bacterias probióticas son microorganismos vivos que ejercen efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador. *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., que son habitantes normales del intestino sano, son especies comunes de probióticos.

35 Lamentablemente, hay muy pocos estudios publicados acerca de los efectos clínicos del suplemento de probióticos en los lactantes. Agostoni, C., et al., *Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition*, J. Pediatr. Gastro. Nutr. 38:365-374 (2004). Aún menos conocida es la capacidad de los probióticos para regular la inflamación intestinal y alterar la propagación de la respuesta inflamatoria a otros órganos en los lactantes.

Los resultados de los estudios relacionados con los efectos de los probióticos en los lactantes son contradictorios.

Por ejemplo, un estudio de 1994 llegó a la conclusión de que la administración de una leche maternizada infantil estándar enriquecida con *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* reducía la prevalencia de la diarrea nosocomial comparada con placebo. Saavedra, J, *et al.*, *Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to Infants in Hospital for Prevention of Diarrhea and Shedding of Rotavirus*, Lancet 344:1049-49 (1994). En contraste, sin embargo, un estudio de 1999 informó de la ausencia de efecto protector alguno de una leche maternizada infantil enriquecida con *Bifidobacterium* solo o en combinación con *S. thermophilus* sobre los episodios de diarrea. Phuapradit, P., *et al.*, *Reduction of Rotavirus Infection in Children Receiving Bifidobacteria-Supplemented Formula*, J. Med. Assoc. Thai. 82:S43-48(1999).

La Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20040208863 concedida a Versalovic *et al.* está dirigida a un compuesto que tiene actividad anti-inflamatoria y es secretado por bacterias de ácido láctico. La solicitud describe el uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) para inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias. La referencia, sin embargo, está centrada en modelos adultos y no describe ni sugiere que la invención pudiera ser beneficiosa para los lactantes. Como se ha explicado anteriormente, el intestino y el sistema inmune de un lactante son muy diferentes de los de un adulto. Dado que las poblaciones y especies bacterianas varían tan enormemente entre el intestino de un lactante y el de un adulto, y la gran diferencia en madurez del sistema inmune en estas dos poblaciones, no puede darse por supuesto que se alcanzara el mismo resultado en un lactante.

La Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20040147010 concedida a Vidal, *et al.* se refiere a un método para la reducción o prevención de procesos inflamatorios asociados con enfermedad mediada por bacterias en el tracto GI, huesos, piel, ojos, oídos, pulmón y cavidad oral de un humano. El método comprende administrar una cantidad eficaz de ácido lipoteicoico (LTA) a partir de bacterias de ácido láctico y/o administrar una bacteria de ácido láctico que produce LTA. La solicitud observa también que estas composiciones podrían modificar la colonización e infección bacteriana durante el periodo neonatal.

Las cepas bacterianas de la solicitud de Vidal eran *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus johnsonii*. Vidal no indicaba el uso de LGG. De hecho, Vidal describe que "LTAs from Gram-positive bacteria show great diversity from one bacterial strain to another." Solicitud de Vidal, p. [0006]. Por tanto, no debería suponerse que simplemente porque *L. acidophilus* y *L. johnsonii* causaran un efecto anti-inflamatorio en la línea de células colónicas adultas, lo hicieran en todas las especies de *Lactobacillus*.

Vidal observa además que los LTA de ciertas especies de bacterias median un efecto pro-inflamatorio en lugar de un efecto anti-inflamatorio en las células inmunes. Solicitud de Vidal, p. [0005]. Así, dado que LTA puede ser pro-inflamatorio o anti-inflamatorio, dependiendo de la especie bacteriana, la descripción de Vidal está limitada a las especies descritas específicamente. Como Vidal ha reconocido en un artículo publicado, "the biological activity of LTAs [of different bacterial species] cannot be predicted." Vidal, *et al.*, *Lipoteichoic Acids from Lactobacillus johnsonii Strain La1 and Lactobacillus acidophilus Strain La10 Alter the Responsiveness of Human Intestinal Epithelial HT29 Cells to Lipopolysaccharide and Gram-Negative Bacteria*, Infect. Immun. 70:2057-2064 (2002).

Una referencia dirigida al uso de probióticos es Majamaa H *et al.* Probiotics: A novel approach in the management of food allergy" Journal of Allergy and Clinical immunology, Mosby - Yearly Book, inc, US, vol. 99, n° 2, 1997, páginas 179-185.

Una referencia dirigida a los beneficios de LGG con neonatos es Sherman Michael P. *et al.* "Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and Lactobacillus GG" Biometals, vol. 17, no. 3, junio 2004, páginas 285-289.

Sobre la base de las referencias anteriores, el efecto de LGG sobre el sistema inmune infantil no ha sido descrito hasta ahora. Existen grandes y fundamentales diferencias entre el intestino y el sistema inmune del lactante comparados con los de un adulto. Por tanto, los estudios que se centran en individuos adultos o líneas de células de adultos no son útiles para evaluar el efecto de LGG en los lactantes. No se ha demostrado con anterioridad que LGG exhiba un efecto inmune sistémico en los lactantes alimentados con leche maternizada. Adicionalmente, no se ha demostrado que el suplemento de LGG en los lactantes alimentados con leche maternizada previniera o redujera la inflamación sistémica a un nivel similar al de un lactante amamantado. Por consiguiente, sería beneficioso proporcionar un método para reducir o prevenir la inflamación sistémica en los lactantes alimentados con leche maternizada que comprenda la administración de LGG.

Compendio de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

Resumidamente, por tanto, la presente invención está dirigida a un nuevo uso de LGG en combinación con al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (LCPUFA) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o reducción de la inflamación sistémica en un lactante alimentado con leche maternizada.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente invención, se hace referencia ahora a las descripciones siguientes tomadas en asociación con los dibujos adjuntos.

5 La Figura 1 ilustra el efecto de LGG sobre el crecimiento de una cría de rata, expresado como peso corporal a lo largo del periodo de tiempo del estudio.

La Figura 2 ilustra el efecto de LGG sobre la morfología intestinal de las crías de rata, representado por micrografías del tejido intestinal en condiciones de inflamación con o sin la administración de LGG.

10 La Figura 3 ilustra el efecto de LGG sobre la producción del péptido quimioatrayente-1 de los neutrófilos inducido por citocinas (CINC-1) por el intestino (Fig. A), hígado (Fig. B), plasma (Fig. C) y pulmón (Fig. D) utilizando el ensayo de inmunsorbente unido a enzima (ELISA).

La Figura 4 ilustra el efecto de LGG sobre la producción de TNF-α por el plasma (Fig. A) y pulmón (Fig. B) utilizando ELISA.

La Figura 5 ilustra el efecto de LGG sobre la actividad de MPO intestinal del intestino delgado distal (Fig. A) y el pulmón (Fig. B).

15 La Figura 6 ilustra el efecto de LGG sobre las abundancias de citocinas. La Figura A muestra los niveles de citocinas en el pulmón, la Figura B muestra los niveles de citocinas en el hígado, y la Figura C muestra los niveles de citocinas en el plasma.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

20 A continuación, se hará referencia en detalle a las realizaciones de la invención, uno o más ejemplos de las cuales se exponen más adelante. Cada ejemplo se proporciona a modo de explicación de la invención.

Una persona con experiencia ordinaria en la técnica deberá entender que la presente exposición es una descripción de realizaciones ilustrativas.

Abreviaturas

25 Tal como se utilizan en esta memoria, se emplean las abreviaturas siguientes: LGG, *Lactobacillus rhamnosus* GG; LCPUFA, ácido graso poliinsaturado de cadena larga; LPS, lipopolisacárido; IL, interleucina; TNF, factor de necrosis tumoral; CINC-1, quimioatrayente-1 de los neutrófilos inducido por citocinas; GRO/KC, oncogén relacionado con el crecimiento; ELISA, ensayo de inmunsorbente unido a enzima; RT-PCR, reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa; ANOVA, análisis de la varianza; SD, desviación estándar; PAF, factor de activación de las plaquetas; RMS, sustituto de leche de rata; MPO, miloperoxidasa; TLRs, receptores tipo Toll; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; ARA, ácido araquidónico.

Definiciones

El término "probiótico" significa un microorganismo que ejerce efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador.

35 El término "prebiótico" significa un ingrediente alimentario no digerible que estimula el crecimiento y/o la actividad de los probióticos.

Como se utiliza en esta memoria, el término "tratamiento" significa mejoramiento, alivio, o curación de una enfermedad, trastorno, o síntoma de una enfermedad o afección.

El término "reducción" significa disminución en extensión, cantidad, o grado.

40 El término "prevención" significa detención o impedimento de una enfermedad, trastorno, o síntoma de una enfermedad o afección mediante cierta acción.

El término "sistémico", como se utiliza en esta memoria, significa relativo a o que afecta a todo el cuerpo.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que da como resultado una mejora o curación de la enfermedad, trastorno, o síntomas de la enfermedad o afección.

El término "prematuro" significa un lactante nacido antes del final de la trigésimoséptima semana de la gestación.

45 El término "lactante" significa un humano que tiene una edad menor que aproximadamente 1 año.

Como se utiliza en esta memoria, el término "leche maternizada" significa una composición que satisface los requerimientos de nutrientes de un lactante por ser un sustituto de la leche humana. En los Estados Unidos, los

contenidos de una leche maternizada están dictados por las regulaciones federales expuestas en las Secciones 21 C.F.R. 100, 106, y 107. Estas regulaciones definen los niveles de macronutrientes, vitaminas, minerales, y otros ingredientes en un esfuerzo para estimular las propiedades nutricionales y otras de la leche de mama humana.

5 Invención

Conforme a la presente invención, se ha descubierto un nuevo uso de LGG en combinación con al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (LCPUFA) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una inflamación sistémica en un lactante alimentado con leche maternizada.

10 LGG es una cepa probiótica aislada de flora intestinal humana sana. Fue descrita en la Patente de EE.UU. n° 5.032.399 concedida a Gorbach, *et al.*, que se incorpora en la presente memoria en su totalidad, por referencia a la misma. LGG es resistente a la mayoría de los antibióticos, estable en presencia de ácido y bilis, y se fija ávidamente a las células mucosales del tracto intestinal humano. Sobrevive durante 1-3 días en la mayoría de los individuos y hasta 7 días en el 30% de los mismos. Además de su capacidad de colonización, LGG afecta también beneficiosamente a las respuestas inmunes mucosales. LGG está depositado con la autoridad
15 depositaria American Type Culture Collection bajo el número de acceso ATCC 53103.

En el uso de la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de LGG puede corresponder a entre aproximadamente 1×10^4 y 1×10^{12} cfu (unidades formadoras de colonia)/L/kg/día para un lactante. En otra realización, la presente invención comprende la administración de entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^9 cfu/L/kg/día LGG a un lactante. En otra realización adicional, la presente invención comprende la administración
20 de aproximadamente 1×10^8 cfu/L/kg/día LGG a un lactante.

LCPUFAs adecuados útiles en la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, ácido- α -linoleico, ácido γ -linoleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosapentaenoico (EPA), ARA y DHA. En el uso de la presente invención, una cantidad eficaz de LCPUFA puede corresponder a entre 3 mg por kg de peso corporal al día y 150 mg por kg de peso corporal al día. En una realización de la invención, la cantidad es de 6 mg por kg de peso corporal al día a 100 mg por kg de peso corporal al día. En otra realización, la cantidad es de 10 mg por kg de peso corporal al día a 60 mg por kg de peso corporal al día.

La forma de administración de LGG y LCPUFA en el uso de la invención no es crítica, con tal que se administre una cantidad terapéuticamente eficaz de LGG en combinación con al menos un LCPUFA. Muy convenientemente, el LGG y LCPUFA se suplementan en la leche maternizada que se suministra luego a un
30 lactante.

En una realización, la leche maternizada para uso en la presente invención es nutricionalmente completa y contiene tipos y cantidades adecuadas de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. La cantidad de lípidos o grasas puede variar típicamente desde 3 a 7 g/100 kcal. La cantidad de proteínas puede variar típicamente desde 1 a 5 g/100 kcal. La cantidad de carbohidratos puede variar típicamente de 8 a 12 g/100 kcal.
35 Las fuentes de proteínas pueden ser cualesquiera utilizadas en la técnica, p.ej., leche desnatada, proteína de suero, caseína, proteína de soja, proteína hidrolizada, aminoácidos, y similares. Las fuentes de carbohidratos pueden ser cualesquiera utilizadas en la técnica, p.ej., lactosa, glucosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón, sólidos de jarabe de arroz, y similares. Las fuentes de lípidos pueden ser cualesquiera utilizadas en la técnica, p.ej., aceites vegetales tales como aceite de palma, aceite de soja, palmoleína, aceite de coco, aceites triglicéridos de cadena media, aceite de girasol rico en oleico, aceite de cártamo rico en oleico, y similares.

Convenientemente, puede utilizarse una leche maternizada disponible comercialmente. Por ejemplo, Enfamil®, Enfamil® Leche maternizada Prematura, Enfamil® con Hierro, Lactofree®, Nutramigen®, Pregestimil®, y ProSobee® (disponibles de Mead Johnson & Company, Evansville, IN, U.S.A.) pueden suplementarse con
45 niveles adecuados de LGG y LCPUFA y utilizarse en la práctica de la invención.

En una realización de la invención, LGG y LCPUFA pueden combinarse con uno o más probióticos adicionales para tratar o prevenir la inflamación sistémica en los lactantes alimentados con leche maternizada. Cualquier probiótico conocido en la técnica será aceptable en esta realización. En una realización particular, el probiótico se selecciona del grupo constituido por *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

50 En otra realización de la invención, LGG y LCPUFA pueden combinarse con uno o más prebióticos para tratar o prevenir la inflamación sistémica en los lactantes alimentados con leche maternizada. Cualquier prebiótico conocido en la técnica será aceptable en esta realización. Los prebióticos de la presente invención pueden incluir lactulosa, galacto-oligosacárido, fructo-oligosacárido, isomalto-oligosacárido, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, xilo-oligosacárido, y gentio-oligosacáridos.

55 En una realización, se administra LGG en combinación con DHA. En otra realización, se administra LGG en combinación con ARA. En otra realización adicional, se administra LGG en combinación con DHA y ARA. Una leche maternizada disponible comercialmente para lactantes que contiene DHA, ARA, o una combinación de los

mismos puede suplementarse con LGG y utilizarse en la presente invención. Por ejemplo, Enfamil® LIPIL®, que contiene niveles eficaces de DHA y ARA, está disponible comercialmente y puede suplementarse con LGG y utilizarse en la presente invención.

5 En una realización, se utilizan a la vez DHA y ARA en combinación con LGG para tratarla inflamación sistémica en los lactantes. En esta realización, la ratio en peso de ARA:DHA es típicamente de 1:3 a 9:1. En una realización de la presente invención, esta ratio es de 1:2 a 4:1. En otra realización adicional, la ratio es de 2:3 a 2:1. En una realización particular, la ratio es aproximadamente 2:1.

10 La cantidad eficaz de DHA en una realización de la presente invención es típicamente de 3 mg por kg de peso corporal al día a 150 mg por kg de peso corporal al día. En una realización de la invención, la cantidad es de 6 mg por kg de peso corporal al día a 100 mg por kg de peso corporal al día. En otra realización, la cantidad es de 10 mg por kg de peso corporal al día a 60 mg por kg de peso corporal al día. En otra realización adicional, la cantidad es de 15 mg por kg de peso corporal al día a 30 mg por kg de peso corporal al día.

15 La cantidad eficaz de ARA en una reacción de la presente invención es típicamente de 5 mg por kg de peso corporal al día a 150 mg por kg de peso corporal al día. En una realización de esta invención, la cantidad varía de 10 mg por kg de peso corporal al día a 120 mg por kg de peso corporal al día. En otra realización, la cantidad varía de 15 mg por kg de peso corporal al día a 90 mg por kg peso corporal al día. En otra realización adicional, la cantidad varía de 20 mg por kg de peso corporal al día a 60 mg por kg de peso corporal al día.

20 La cantidad de DHA en leches maternizadas para lactantes para uso con la presente invención vaya típicamente de 5 mg/100 kcal a 80 mg/100 kcal. En una realización de la presente invención, la misma varía de 10 mg/100 kcal a 50 mg/100 kcal; y en otra realización, de 15 mg/100 kcal a 20 mg/100 kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de DHA es aproximadamente 17 mg/100 kcal.

25 La cantidad de ARA en las leches maternizadas para lactantes para uso con la presente invención varía típicamente de 10 mg/100 kcal a 100 mg/100 kcal. En una realización de la presente invención, la cantidad de ARA varía de 15 mg/100 kcal a 70 mg/100 kcal. En otra realización, la cantidad de ARA varía de 20 mg/100 kcal a 40 mg/100 kcal. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de ARA es aproximadamente 34 mg/100 kcal.

30 La leche maternizada enriquecida con aceites que contienen DHA y ARA para uso con la presente invención puede producirse utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllos pueden añadirse a la leche maternizada reemplazando una cantidad equivalente de un aceite, tal como aceite de girasol rico en oleico, presente normalmente en la leche maternizada. Como otro ejemplo, los aceites que contienen de HDA y ARA pueden añadirse a la leche maternizada reemplazando una cantidad equivalente del resto de la mezcla de grasas totales presente normalmente en la leche maternizada sin DHA y ARA.

35 La fuente de DHA y ARA puede ser cualquier fuente conocida en la técnica. En una realización de la presente invención, las fuentes de DHA y ARA son aceites de organismos unicelulares como los dados a conocer en las patentes de Estados Unidos Núms. 5.374.567; 5.550.156; y 5.397.591.

Sin embargo, la presente invención no se limita a tales aceites solamente. DHA y ARA pueden encontrarse en forma natural o refinada.

40 En una realización, la fuente está sustancialmente exenta de EPA. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, la leche maternizada contiene menos de aproximadamente 16 mg EPA/100 kcal; en otra realización menos de aproximadamente 10 mg EPA/100 kcal; y en otra realización adicional menos de aproximadamente 5 mg EPA/100 kcal. Una realización particular no contiene sustancialmente cantidad alguna de EPA. Otra realización está exenta de EPA en el sentido de que incluso cantidades traza de EPA están ausentes de la leche maternizada.

45 Se cree que la provisión de la combinación de LGG con DHA y/o ARA proporciona efectos complementarios o sinérgicos con respecto a las propiedades anti-inflamatorias de las formulaciones que contienen estos agentes. Si bien no se desea quedar ligados a esta o cualquier otra teoría, se cree que los probióticos tales como LGG imparten efectos anti-inflamatorios en parte por interacción con receptores específicos, conocidos como receptores tipo Toll (TLRs) en la superficie de células inmunes específicas. La interacción directa o indirecta entre LGG y estos receptores inicia una cascada de transducción de señales intracelulares que da como resultado la alteración de la expresión génica en estas células diana. Es esta interacción específica y la alteración resultante en la expresión génica y otros efectos celulares lo que se cree está implicado en la modulación de la inflamación.

55 En contraste, se cree que los ácidos grasos omega-3 tales como DHA imparten acción anti-inflamatoria por alteración de la producción de mediadores pro-inflamatorios, derivados de ácidos grasos, conocidos generalmente como eicosanoides. Los ácidos grasos omega-6, tales como ARA, que están localizados en el agregado fosfolipídico de las membranas celulares, se desprenden durante la respuesta inflamatoria y liberan un agregado de ARA libre. Sobre este agregado de ARA actúan luego dos clases de enzimas, conocidas como

- lipoxigenasas y ciclooxigenasas, que producen un espectro específico de eicosanoides que incluyen los prostanoïdes de la serie 2, tales como prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos. Se sabe que estos eicosanoides ejercen una plétora de acciones pro-inflamatorias en muchos tipos de células y órganos. Es sabido que las dietas ricas en ácidos grasos omega-3, tales como EPA y DHA, son competidores de los ácidos grasos omega-6 en varios pasos de este proceso y, por tanto, moderan los efectos pro-inflamatorios de ARA. Por ejemplo, los ácidos grasos omega-3 modulan la elongación de los ácidos grasos omega-6 en ARA, la incorporación de ARA en el agregado fosfolipídico de la membrana celular, y la producción de eicosanoides pro-inflamatorios a partir de ARA. La combinación de DHA y ARA, por tanto, da lugar a acciones distintas, pero complementarias, que moderan la respuesta inflamatoria en múltiples tejidos.
- 10 Como alternativa a una leche maternizada, el LGG y LCPUFA pueden administrarse como suplemento no integral a la alimentación con leche maternizada. Por ejemplo, LGG puede ingerirse en forma de una píldora, tableta, cápsula, caplet, polvo, líquido o gel. En esta realización de la invención, puede ingerirse un suplemento de LGG en combinación con otros suplementos nutrientes, tales como vitaminas, o en combinación con un suplemento de LCPUFA, tal como DHA o ARA.
- 15 En otra realización, el LGG y/o LCPUFA se encapsulan en una matriz de azúcar, grasa, o polisacárido para aumentar adicionalmente la probabilidad de supervivencia bacteriana. Las composiciones de la presente invención pueden proporcionarse también en una forma adecuada para lactantes seleccionada del grupo constituido por leche maternizada de seguimiento, bebida, leche, yogur, zumo de fruta, bebida basada en fruta, tableta masticable, galleta, galleta salada crujiente, o una combinación de los mismos.
- 20 En la presente invención, el lactante se alimenta con leche maternizada. En una realización, el lactante se alimenta con leche maternizada desde el nacimiento. En otra realización, el lactante se amamanta desde el nacimiento hasta una edad que es inferior a un año, y se alimenta después de ello con leche maternizada, en cuyo momento comienza el suplemento de LGG y LCPUFA.
- 25 En una realización particular de la presente invención, el uso comprende el tratamiento o la prevención de la inflamación sistémica en un lactante prematuro alimentado con leche maternizada. En este uso, LGG y LCPUFA pueden administrarse al lactante prematuro en la forma de una leche maternizada o cualquier otra forma adecuada. En otra realización, puede administrarse LGG al lactante prematuro en combinación con DHA y/o ARA para crear un efecto anti-inflamatorio potencialmente sinérgico.
- 30 En un uso particular de la presente invención, la administración de LGG y LCPUFA reduce o previene la liberación sistémica de una o más citocinas o quimiocinas pro-inflamatorias en un lactante alimentado con leche maternizada. Como se utiliza en esta memoria, citocinas o quimiocinas "pro-inflamatorias" incluyen las conocidas en la técnica que están implicadas en la regulación creciente de reacciones inflamatorias. Ejemplos incluyen, pero sin limitación, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, y GRO/KC.
- 35 Las quimiocinas son un grupo de citocinas que hacen posible la migración de leucocitos desde la sangre a los tejidos en el sitio de inflamación. Cuando se producen en cantidades excesivas, las quimiocinas pueden conducir a daño del tejido sano. El oncogén relacionado con el crecimiento (GRO/KC) es una quimiocina que recluta células inmunes en el sitio de inflamación. El mismo es el equivalente humano al quimioatrayente de los neutrófilos de rata inducido por citocinas (CLNC-1), y está relacionado funcionalmente con la familia de las interleucinas-8.
- 40 LGG y LCPUFA reducen o previenen la liberación sistémica de MPO en un lactante alimentado con leche maternizada. MPO es una proteína que contiene hierro localizada en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y en los lisosomas de los monocitos. El mismo utiliza hidrógeno-peroxidasa para convertir el cloruro en ácido hipocloroso. El ácido hipocloroso producido reacciona luego con las bacterias y las destruye. Durante la inflamación, los niveles de MPO alcanzan un máximo a medida que el mismo intenta destruir los patógenos. Así pues, la enzima es extremadamente útil como marcador de inflamación. Frode, T. & Medeiros, Y. *Myeloperoxidase and Adenosine-Deaminase Levels in the Pleural Fluid Leakage Induced by Carrageenan in the Mouse Model of Pleurisy*, MI 10:4, 223-227 (2001).
- 45 Como se verá en los ejemplos, se ha demostrado que LGG reduce la inflamación sistémica en un lactante alimentado con leche maternizada a un nivel similar al de los lactantes amamantados. El daño físico en la mucosa intestinal de las crías de rata alimentadas con leche maternizada se reducía a un nivel similar al de las crías de rata alimentadas con leche materna cuando sus dietas se suplementaban con LGG. Adicionalmente, los niveles de CINC-1, MPO, y diversas citocinas en las crías de rata alimentadas con leche maternizada se reducían a niveles similares al de las crías de rata alimentadas con leche materna cuando se suplementaban con LGG.
- 50 Los ejemplos siguientes describen diversas realizaciones de la presente invención. Otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones de esta memoria serán evidentes para un experto en la técnica a partir de una consideración de la memoria descriptiva o la práctica de la invención como se describe en esta memoria. Se pretende que la memoria descriptiva, junto con los ejemplos, se considere únicamente como ilustrativa, viniendo indicado el alcance de la invención por las reivindicaciones que siguen a los ejemplos. En los ejemplos, todos los porcentajes se
- 55

expresan basados en peso, a no ser que se indique otra cosa.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe los materiales y métodos necesarios para demostrar el efecto de LGG sobre las crías de rata recién nacidas alimentadas con leche maternizada. En dos experimentos separados, se asignaron aleatoriamente 10 crías de rata Sprague-Dawley (Taconic, Germantown, NY) a dos grupos de alimentación por gastrostomía con 5 ratas por grupo. La alimentación por gastrostomía, utilizando el modelo de cría de rata "cría en la copa", se inició el día 7 de vida de las crías de rata. Los tubos de alimentación por gastrostomía se construyeron a partir de secciones de 14 cm de tubo de polietileno que se insertaron en el estómago de las crías. Éste es un modelo utilizado comúnmente en estudios de nutrición experimental cuando es importante manipular la composición nutricional en ausencia de alimentación materna. La colocación de la gastrostomía se realizó bajo anestesia con isoflurano. Bombas de jeringuilla controladas por temporizador se conectaron a los tubos de alimentación y se ajustaron para alimentar las ratas durante los primeros 20 minutos de cada hora a un caudal dependiente del peso. Se utilizaron 5 ratas de la misma edad criadas por su madre como controles de referencia.

Durante un periodo de aclimatación de 2 días, las crías de rata alimentadas por gastrostomía se alimentaron con sustituto de leche de rata (RMS). El componente proteínico del RMS era entre 30 y 40 g/kg/día, que es similar al de la leche materna y es necesario para el crecimiento normal. Uno de los grupos alimentados con RMS se suministró también con un suplemento de 1×10^8 cfu/L/kg/día LGG. El otro grupo se alimentó con RMS solo, sin suplemento de LGG. Todos los grupos alimentados por gastrostomía recibieron la misma cantidad de grasa y carbohidratos.

Se disolvió lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 0127:B8 (LPS; Sigma, St. Louis, MO) en agua por agitación vorticial a una concentración de 2 mg/ml. Las ratas alimentadas por gastrostomía recibieron entre 0,25 y 0,5 mg/kg/día de LPS por el tubo de gastrostomía comenzando 2 días después del comienzo de la alimentación artificial. Las crías recibieron suplemento de LPS durante 6 días. En estudios piloto se determinó que esta dosis daba como resultado temblor ocasional, piloerección, y ganancia de peso escasa, pero no se asoció con un aumento significativo de la mortalidad a lo largo de un periodo de 6 días.

Al final del periodo de tratamiento de 6 días, las crías de rata se sacrificaron por eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico. Se extirpó el intestino delgado y se separó en 3 partes: íleon, yeyuno, y duodeno, se guardó a -80°C para ensayos enzimáticos y ELISA, o se fijó en formalina neutra tamponada al 10% para morfología intestinal. El pulmón, hígado y plasma se guardaron a -80°C para ensayos enzimáticos y ELISA.

Se utilizó el software estadístico Sigmastat (SPSS, Chicago, IL) para analizar el peso corporal, las medidas de vello, y las actividades enzimáticas, MPO, ELISA para CINC-1, y TNF- α y los resultados de densitometría para RT-PCR. Todos los datos se consignaron como valores medios \pm desviación estándar (SD). Se utilizó un análisis de la varianza de una sola vía entre grupos (ANOVA) para determinar si estaba presente una diferencia significativa entre todos los grupos de tratamiento.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG sobre el crecimiento de las crías después de alimentación por gastrostomía. Las crías de rata se pesaron diariamente después de la alimentación por gastrostomía y se compararon con animales de referencia amamantados. La Figura 1 muestra que los animales amamantados crecían más rápidamente que las crías alimentadas por gastrostomía tratadas con LPS. Los gráficos lineales representan la mayor velocidad de aumento de peso corporal de las crías con el aumento expresado de tiempo desde el comienzo del estudio. El suministro de LGG a las crías alimentadas por gastrostomía tratadas con LPS no mejoraba la ganancia de peso.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG sobre la morfología intestinal de las crías de rata. Los estudios de microscopía se centraron en el íleon debido a que ésta es una región que es muy susceptible a ciertas patologías en los lactantes (p.ej., enterocolitis necrotizante y perforaciones relacionadas con enterocolitis no necrotizante). Muestras de íleon fijadas con formalina se incrustaron en parafina; se cortaron secciones de 6 μm utilizando un microtomo de parafina Reichert-Jung 2030. Las secciones se tiñeron luego con un tinte de rutina hematoxilina y eosina (H&E). La Figura 2 muestra los resultados de esta tinción.

Las secciones de íleon de las crías de rata tratadas con LPS (Figs. 2G-2I) mostraban una metaplasia notable en el epitelio veloso, con aclaramiento incrementado del citoplasma, comparadas con los controles amamantados (Figs. 2A-2C). Las Figuras 2G-2F muestran que estas secciones exhibían también expansión de la lámina propia por un infiltrado linfoplasmacítico, adelgazamiento de la mucosa muscular, y cambios regenerativos en las criptas que incluían número y ramificación incrementados de criptas, así como actividad mitótica incrementada. Estas características estaban ausentes en los animales de control amamantados, y se atenuaban en el grupo tratado con LPS más LGG (Figuras 2D-2F). El daño físico en la mucosa intestinal del grupo LPS/LGG se reducía hasta un nivel similar al de las crías de rata alimentadas con leche materna. En los últimos intestinos, el cambio metaplásico en las velosidades era intermedio entre el observado en los tejidos de los grupos de control y los de LPS. Notablemente, esto parece ocurrir como un espectro, como se ilustra por la metaplasia observada en las velosidades, que se aproxima a la del grupo

tratado con LPS.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG sobre CINC-1. Se determinaron los niveles de CINC-1 en intestino delgado y plasma mediante kits del Ensayo Inmunométrico Enzimático TiterZyme para el oncogén relacionado con el crecimiento de las ratas/CINC-1 (Assay Designs, Ann Arbor, MI). Se determinó la absorbancia a 450 nm, y se calculó la concentración utilizando la ecuación derivada de una curva lineal estándar.

Para investigar adicionalmente los efectos de las dietas sobre el péptido CINC-1, se evaluó por ELISA la producción de CINC-1 en el intestino delgado, hígado, pulmón y plasma. En un experimento inicial, la administración de LPS a las crías de rata causó un aumento aproximado de 4 veces en CINC-1 sobre las crías no tratadas con LPS alimentadas por gastrostomía (datos no presentados). Como se muestra en la Figura 3A, cuando se compararon las crías tratadas con LPS alimentadas por gastrostomía con las ratas tratadas con LPS/LGG y amamantadas, los niveles intestinales de CINC-1 en las crías no diferían significativamente entre los 3 grupos, pero sugerían una ligera tendencia hacia ser mayores en el grupo tratado con LPS y sin LGG. Sin embargo, las concentraciones de CINC-1 en hígado (Fig. 3B) y plasma (Fig. 3C) eran casi 2 veces mayores en el grupo tratado con LPS que no recibió LGG, pero esto se atenúa significativamente con LGG. El pulmón (Fig. 3D), utilizado aquí para determinar si el efecto del probiótico podría extenderse a un órgano distal, mostraba también un aumento significativo (aproximadamente 4 veces) de CINC-1 con tratamiento de LPS cuando se comparaba con controles amamantados, pero esto se atenúa significativamente con LGG. En hígado y plasma, el suplemento de LGG reducía los niveles de CINC-1 a un nivel que era muy similar al de las crías de rata alimentadas con leche materna. Estos resultados indican que LGG tiene la capacidad de reducir la inflamación sistémica en un lactante alimentado con leche maternizada a un nivel que es similar al de un lactante amamantado.

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG sobre los niveles de TNF- α en las crías de rata. Se determinaron los niveles de TNF- α en intestino delgado y plasma mediante kits del Ensayo Inmunométrico Enzimático TiterZyme (Assay Designs, Ann Arbor, MI). Se determinó la absorbancia a 450 nm, y se calculó la concentración utilizando la ecuación derivada de una curva lineal estándar.

Para investigar adicionalmente los efectos de las dietas sobre TNF- α , se evaluó por ELISA la producción de TNF- α en plasma y pulmón. La Figura 4 ilustra el efecto de LGG sobre la producción de TNF- α a partir de plasma (Fig. 4A) y pulmón (Fig. 4B) utilizando ELISA. La Figura 4 indica que los niveles de TNF- α eran significativamente mayores en las crías alimentadas por gastrostomía tratadas con LPS que en las crías amamantadas, y que LGG mitigaba significativamente el aumento de TNF- α inducido por LPS tanto en plasma como en pulmón.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG sobre los niveles de MPO. La actividad de MPO, una medida de la acumulación de neutrófilos y un marcador de lesión tisular, se determinó por un procedimiento enzimático estándar. Muestras de intestino se homogeneizaron en hielo en un tampón de KH_2PO_4 0,01 M. Después de centrifugación a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C, los sedimentos se resuspendieron por sonicación en tampón de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB 13,7 mM, KH_2PO_4 50 mM, y ácido acético 50 mM, pH 6,0). El sobrenadante se reservó para análisis ELISA. La suspensión se centrifugó de nuevo a 10.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se incubó luego en un baño maría a 60°C durante 2 horas. La concentración de MPO del sobrenadante se midió por la oxidación de tetrametilbencidina dependiente de H_2O_2 . Se determinó la absorbancia a 650 nm y se comparó con una curva estándar lineal. La proteína se midió utilizando el Ensayo BioRad Dc de Proteínas (BioRad).

La Figura 5 ilustra el efecto de LGG sobre la actividad de MPO en el intestino delgado distal (Fig. 5A) y el pulmón (Fig. 5B). Los niveles de MPO eran significativamente mayores en las crías alimentadas por gastrostomía tratadas con LPS que en las crías amamantadas, y LGG mitigaba significativamente el aumento de MPO inducido por LPS tanto en el intestino delgado distal como en el pulmón. Los niveles reducidos de MPO en las ratas tratadas con LPS/LGG eran muy similares a los de las ratas amamantadas, indicando que LGG reduce la inflamación sistémica en los lactantes alimentados con leche maternizada a un nivel que es similar al nivel de los lactantes amamantados.

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra el efecto de LGG sobre los niveles de diversas citocinas. Se adquirieron kits de cuentas multiplex de LINCO Research, Inc. (St. Charles, MO, USA). Se analizaron las citocinas/quimiocinas mediante un kit que incluía: factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- λ (IFN- λ), interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-18, proteína-1 del Quimioatrayente de Monocitos (MCP-1), GRO/KC (CINC-1 de rata), y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). El ensayo multiplex se realizó conforme a las especificaciones del fabricante. Se generaron curvas estándar para cada citocina-quimiocina utilizando las concentraciones de referencia suministradas por los fabricantes. Los datos brutos (intensidad media de fluorescencia) se analizaron por el Software MasterPlex Quantitation (MiraiBio, Inc., Alameda, CA, USA) para obtener los valores de concentración.

5 Para investigar ulteriormente los efectos de LPS y LGG sobre las citocinas, se analizaron 14 citocinas/quimiocinas de pulmón, hígado, plasma e intestino delgado distal. Éstas incluían: factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- λ (IFN- λ), interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-18, proteína-1 Quimioatrayente de Monocitos (MCP-1), GRO/KC (CINC-1 de rata), y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).

10 La Figura 6A ilustra que IL-1 β , IL-6, IL-18, GRO/KC (CINC-1 de rata), y TNF- α de pulmón eran significativamente mayores en las crías alimentadas por gastrostomía tratadas con LPS que en las crías amamantadas y que LGG mitigaba significativamente el aumento inducido por LPS de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, GRO/KC (CINC-1 de rata), y TNF- α . La Figura 6B muestra que los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-18, and GRO/KC (CINC-1 de rata) eran significativamente mayores en las crías alimentadas por gastrostomía tratadas con LPS que en las crías amamantadas, y que LGG mitigaba significativamente el aumento inducido por LPS de dichas citocinas/quimiocinas. La Figura 6C muestra también un aumento importante de los niveles de citocinas/quimiocinas en el plasma de los animales que recibieron LPS. Este efecto se mitigaba en los animales que recibieron LGG.

15 Estos resultados indican que el suplemento de LGG en los lactantes alimentados con leche maternizada reduce la inflamación sistémica. Además, los resultados indican que LGG reduce la inflamación sistémica en los lactantes alimentados con leche maternizada hasta un nivel que es similar al de los lactantes amamantados. Esto se ilustra en los resultados descritos en esta memoria por comparación del grupo tratado con LGG y el grupo alimentado exclusivamente con leche materna. En varios casos, la administración de LGG da como resultado una respuesta inflamatoria particular que no es significativamente diferente entre el grupo tratado con LGG y el grupo alimentado con leche materna, lo que indica una respuesta inflamatoria similar.

20 La invención reduce la inflamación en el tracto gastrointestinal, hígado, plasma, pulmones, y cerebro y previene o reduce el daño físico en la mucosa intestinal de un lactante alimentado con leche maternizada. Dado que la presente invención puede utilizarse para mejorar la afección inflamatoria en un lactante, la misma puede prevenir también la aparición de infecciones o enfermedades deletéreas.

25

REIVINDICACIONES

1. Uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG en combinación con al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga para la fabricación de una leche maternizada a fin de prevenir o reducir la inflamación sistémica en un lactante alimentado con leche maternizada, por administración al lactante de una cantidad eficaz de *Lactobacillus rhamnosus* GG en combinación con al menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga.
5
2. El uso según la reivindicación 1, en donde el ácido graso poliinsaturado de cadena larga comprende ácido docosahexaenoico o ácido araquidónico.
3. El uso según la reivindicación 2, en donde el ácido graso poliinsaturado de cadena larga comprende ácido docosahexaenoico en una cantidad comprendida entre 3 mg por kg de peso corporal al día y 150 mg por kg de peso corporal al día.
10
4. El uso según la reivindicación 2, en donde el ácido graso poliinsaturado de cadena larga comprende ácido araquidónico en una cantidad comprendida entre 5 mg por kg de peso corporal al día y 150 mg por kg de peso corporal al día.
5. El uso según la reivindicación 1, en donde el ácido graso poliinsaturado de cadena larga comprende ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico.
15
6. El uso según la reivindicación 1, en donde la inflamación sistémica se previene o reduce en hígado, plasma, y pulmones del lactante.
7. El uso según la reivindicación 1, en donde el *Lactobacillus rhamnosus* GG y el ácido graso poliinsaturado de cadena larga son consumidos por el lactante.
8. El uso según la reivindicación 1, en donde la cantidad eficaz de *Lactobacillus rhamnosus* GG es entre aproximadamente 1×10^4 y 1×10^{10} cfu/L/kg/día.
20
9. El uso según la reivindicación 1, en donde la cantidad eficaz de *Lactobacillus rhamnosus* GG es entre aproximadamente 1×10^6 y 1×10^9 cfu/L/kg/día.
10. El uso según la reivindicación 1, en donde la cantidad eficaz de *Lactobacillus rhamnosus* GG es aproximadamente 1×10^8 cfu/L/kg/día.
25

Figura 1:

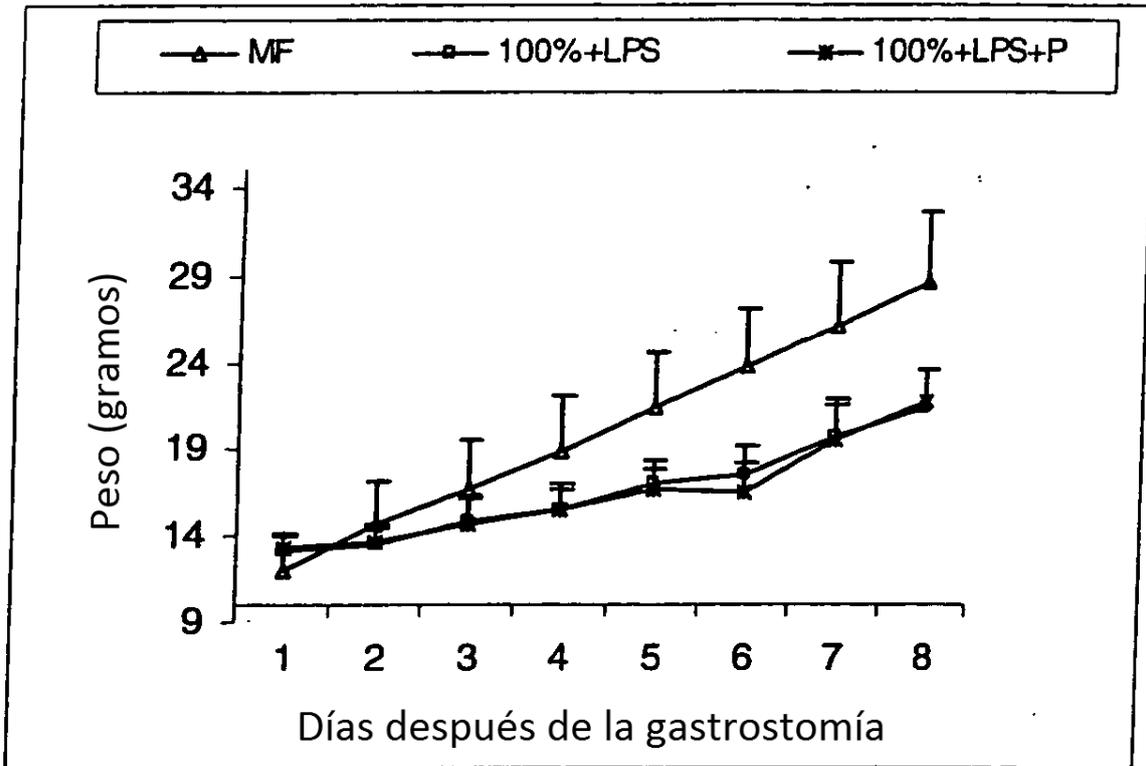


Figura 2:

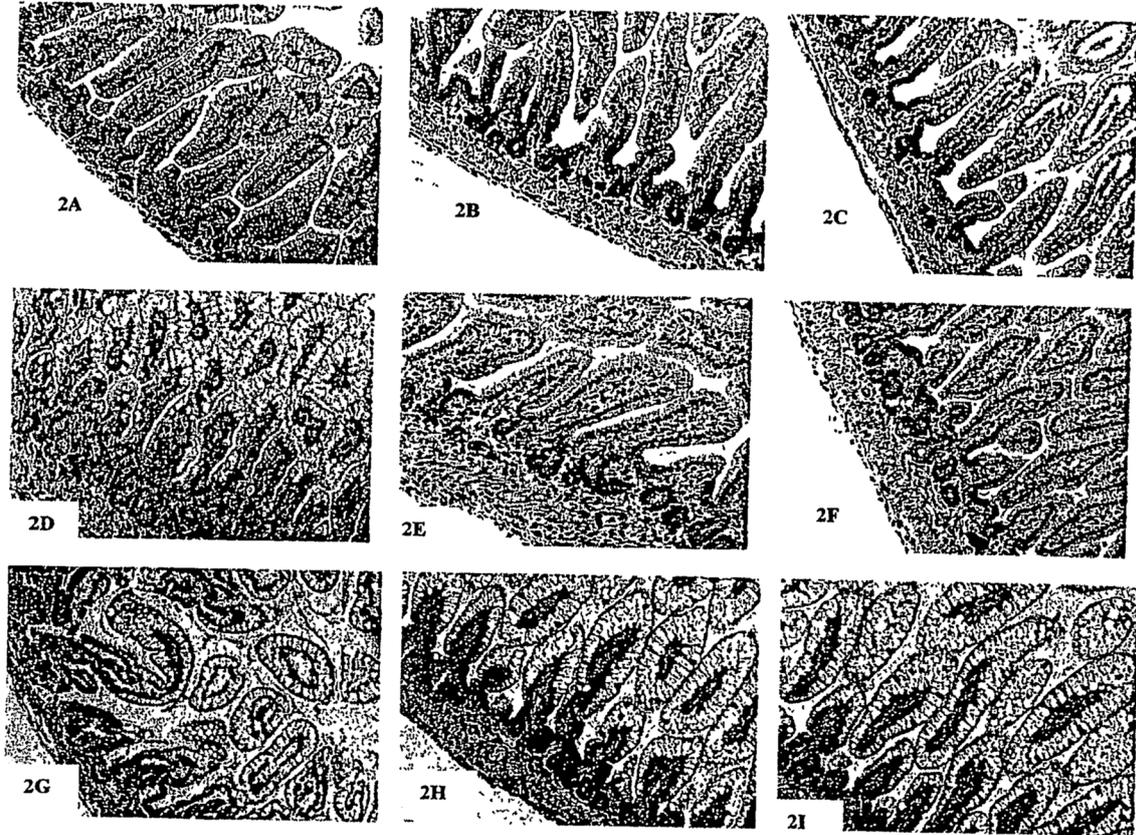


Figura 3:

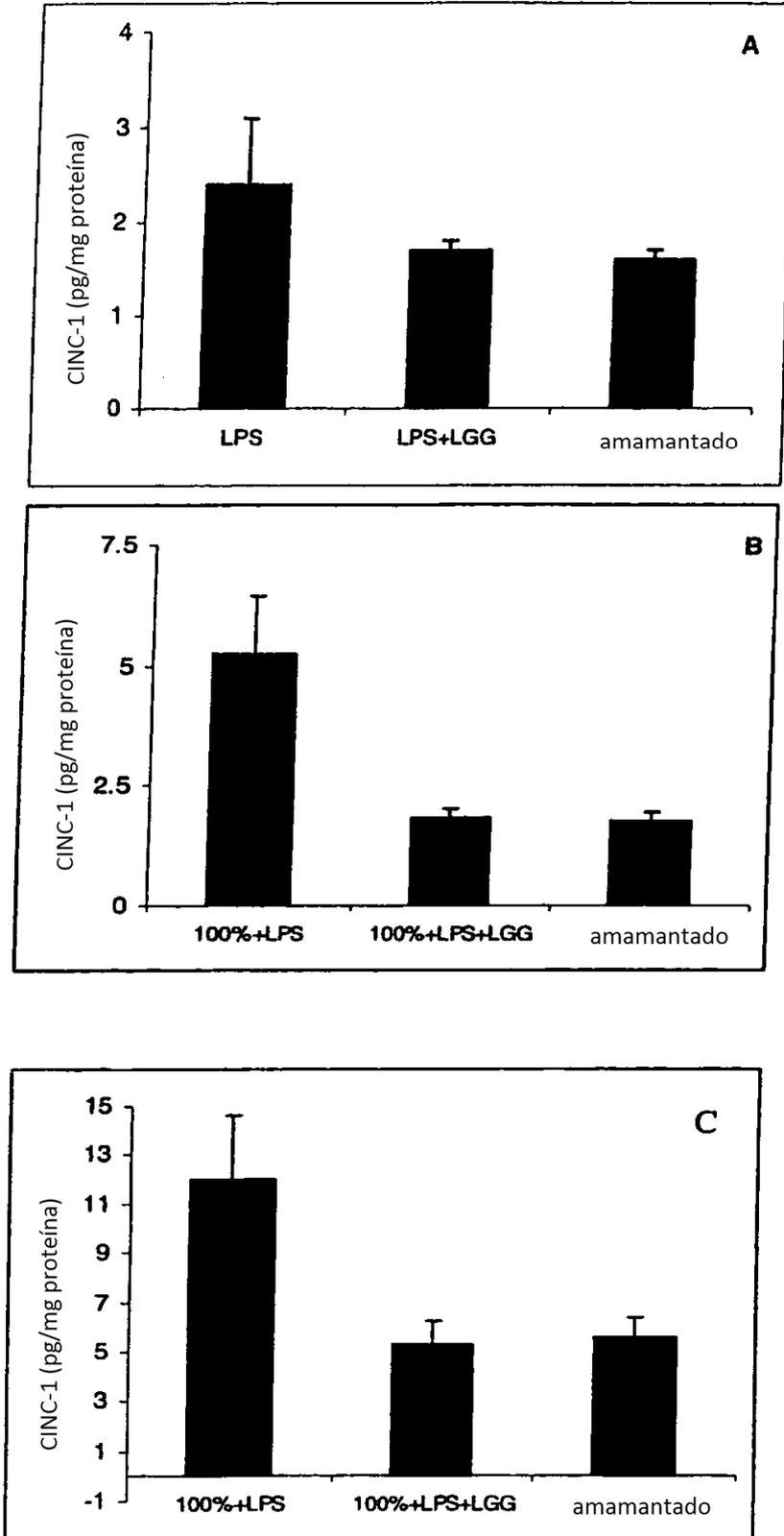


Figura 3 (continuación):

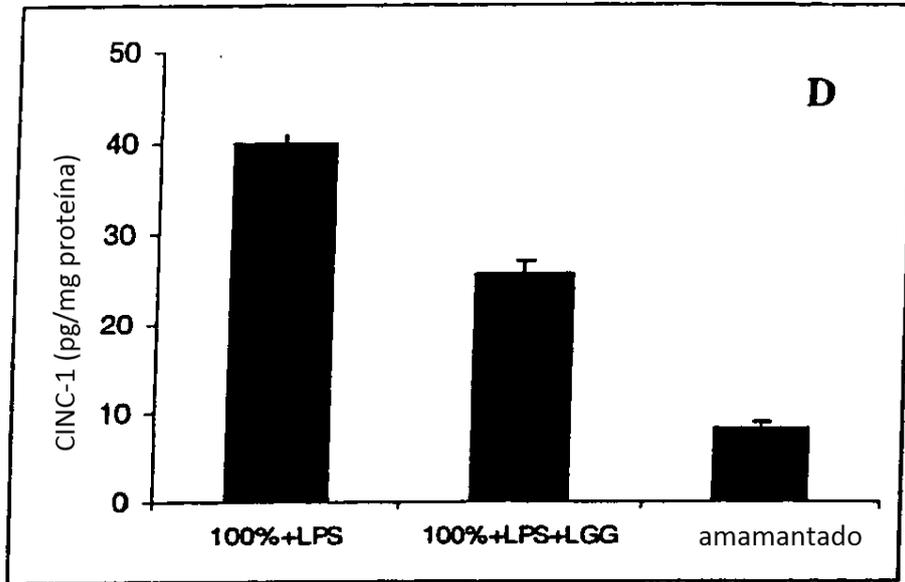


Figura 4

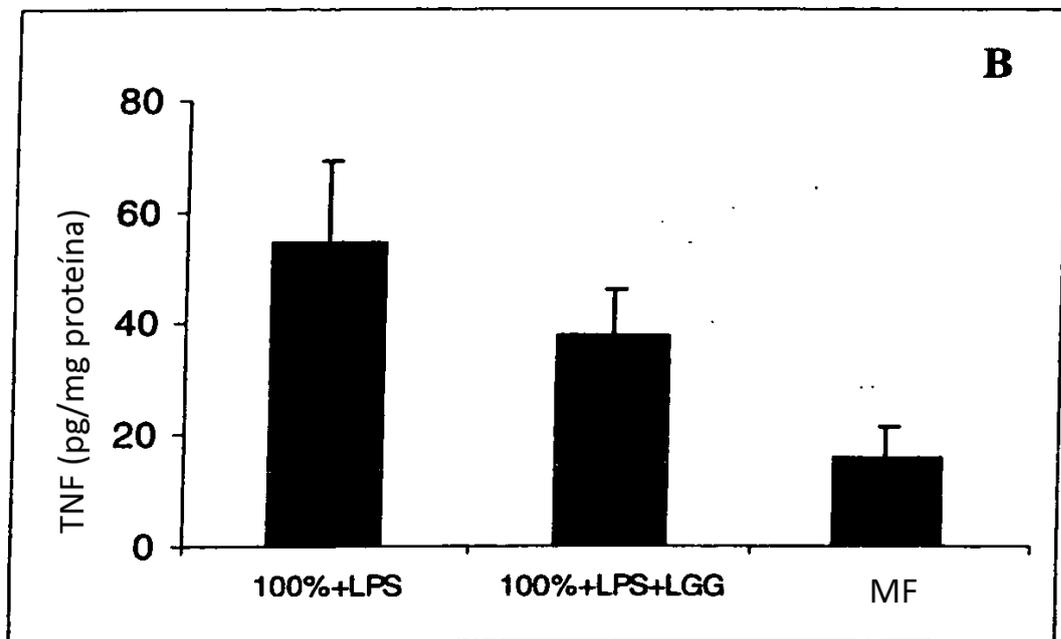
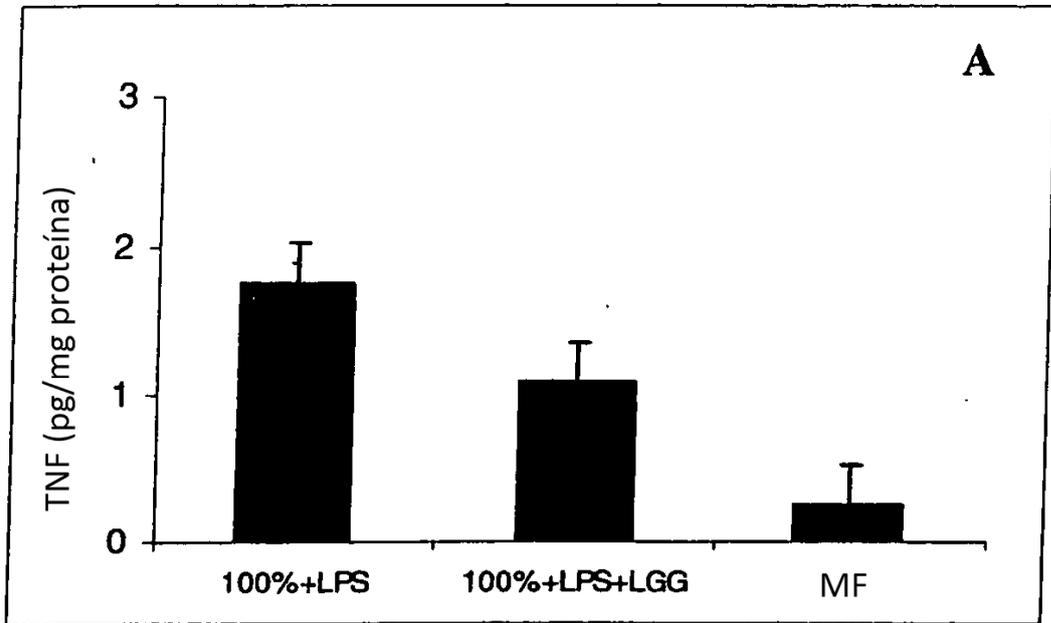


Figura 5

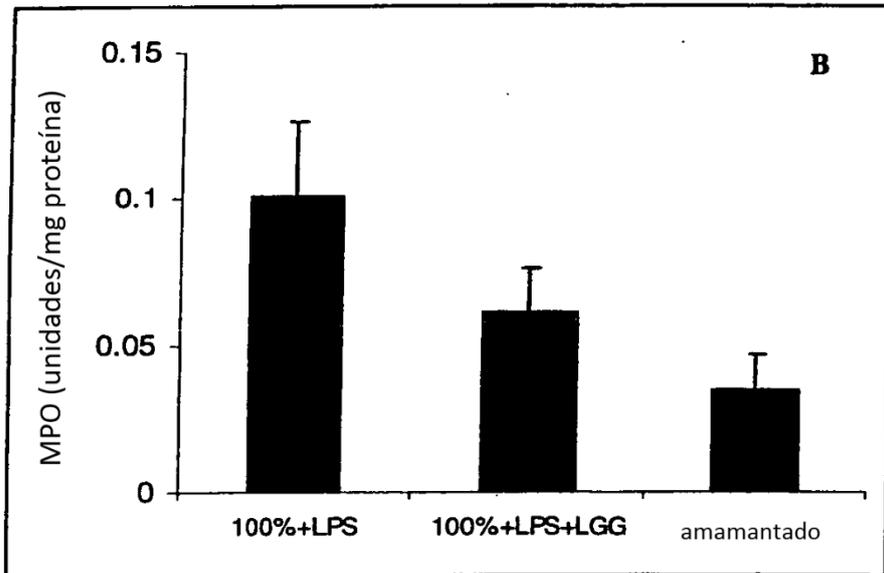
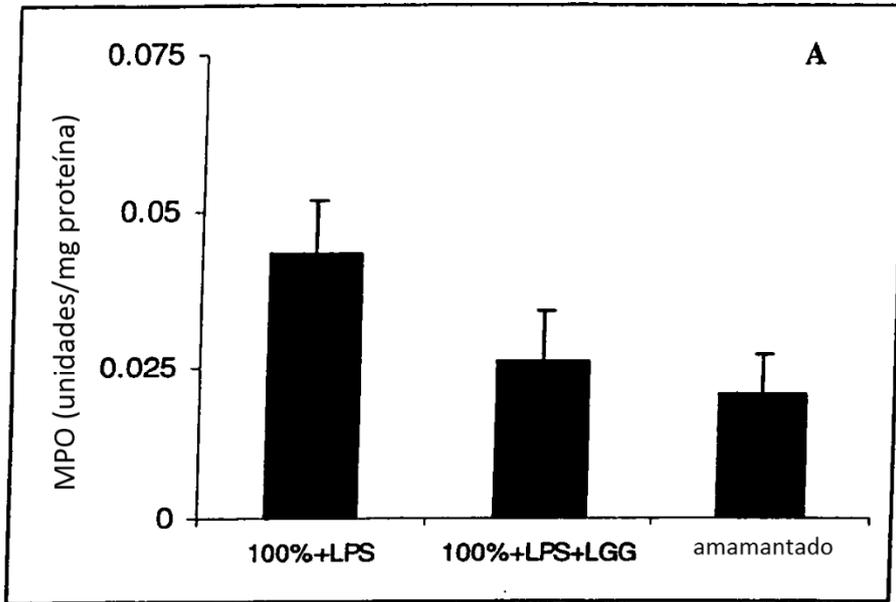


Figura 6

