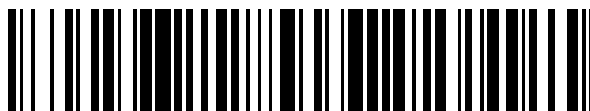


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 375**

51 Int. Cl.:

A23C 9/12 (2006.01)

A23C 21/02 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2008** **PCT/FR2008/001372**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2009** **WO09074754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2008** **E 08858623 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020** **EP 2197287**

54 Título: **Uso de una cepa de Bifidobacterium para la preparación de una composición destinada a la prevención y/o al tratamiento de manifestaciones de tipo alérgico**

30 Prioridad:

03.10.2007 FR 0706925

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

14.09.2020

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**AUBERT-JACQUIN, CÉCILE;
LECROIX, FRANCIS;
PERRIN, EMMANUEL y
PETAY, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 782 375 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 una cepa de *Bifidobacterium* para la preparación de una composición destinada a la prevención y/o al tratamiento de manifestaciones de tipo alérgico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de composiciones, particularmente de una fórmula infantil, que permite reducir las manifestaciones de tipo alérgico a las proteínas de la leche de vaca. Estas composiciones se obtienen a partir de un cultivo de *Bifidobacterium* sin hidrólisis de las proteínas de la leche.

10 Desde hace varias décadas, la incidencia de enfermedades alérgicas está aumentando en los países industrializados. Así, se estima actualmente que el 20% de la población de los países desarrollados se ve afectada por una forma de alergia como asma, dermatitis atópica u otras formas de manifestaciones. Esta alta incidencia posiciona la alergia actualmente como un problema de salud pública y, por lo tanto, se han emprendido numerosos trabajos de investigación en un intento de aportar soluciones que permitan limitar el desarrollo de estas patologías. Estos trabajos han permitido identificar los 2 primeros años de vida, como un período crítico en la aparición de la enfermedad, y en particular por fases de sensibilización a los alérgenos, desarrollando los niños una sensibilización durante este período que presenta más riesgos de desarrollar posteriormente una alergia. Por otra parte, también está comenzando a descubrirse el papel de la flora intestinal en la génesis de la alergia. En efecto, el establecimiento de la flora intestinal en niños condiciona el desarrollo del sistema inmunitario mucosal (Prescott et al., 2005), y los esquemas de introducción de la flora podrían influir en la orientación inmunitaria hacia la tolerancia oral o al contrario a la sensibilización (Kalliomaki et al., 2001; Sudo et al., 1997).

20 La alergia se define con mayor precisión como una reacción de hipersensibilidad, que implica un mecanismo inmunitario (Johansson et al., 2001). Esta hipersensibilidad provoca síntomas reproducibles, desencadenados por la exposición a un antígeno, a una dosis generalmente tolerada en sujetos normales. Los antígenos que causan una reacción alérgica, los alérgenos, son de naturaleza muy diversa, alimentaria, aérea, animal, etc. Asimismo, los síntomas observados son muy variables, principalmente del tipo cutáneo, digestivo o respiratorio. Las estrategias propuestas en la prevención de la alergia tienen como objetivo disminuir la incidencia de nuevos casos de alergia (prevención primaria), o limitar la duración y evolución de la alergia cuando está instalada (prevención secundaria).

30 En el lactante, las alergias más frecuentes son las alergias alimentarias y, en particular, la alergia a las proteínas de la leche de vaca (APLV). El riesgo es tanto más importante en sujetos atópicos (niños con alto riesgo alérgico, particularmente por el hecho de una herencia alérgica comprobada), lo que justifica una estrategia, en estos niños, de intervención dietética durante la primera infancia. La lactancia materna exclusiva prolongada (> 6 meses), asociada con una diversificación progresiva de alimentos, es la solución de referencia, teniendo la lactancia un efecto potencialmente protector contra la aparición de enfermedades alérgicas (Host and Halken, 2005). Para los niños en riesgo que no se benefician de una lactancia materna, se recomienda otra estrategia que implica una desnaturalización de las proteínas de la leche de vaca por hidrólisis parcial o extensa, o su reemplazo por otras proteínas animales o vegetales (Host et al., 1999). Sin embargo, la eficacia preventiva de estas soluciones sigue siendo controvertida (Osborn and Sinn, 2006a; Osborn and Sinn, 2006b), y el proceso de hidrólisis da como resultado la degradación de la capacidad organoléptica y la calidad nutricional de las proteínas, causando rechazo en algunos niños. En Francia, las fórmulas hidrolizadas también están sometidas a una regulación especial que limita su distribución exclusivamente a la red farmacéutica, lo cual es una restricción adicional para los padres de estos niños en riesgo.

40 El efecto anti-alérgico de las leches fermentadas ha sido descrito, desde un ángulo mecanicista, por Peng *et al.* Los productos estudiados son leches fermentadas probióticas acidificadas (pH = 3,7) de tipo "yogur". En el modelo presentado, el efecto se basa en el doble componente del producto analizado: fermentación y mantenimiento de los fermentos con vida (> 10⁹ UFC/mL). Se analizaron cinco tipos diferentes de fermentos (3 *Lactobacilli*, 1 *Streptococcus thermophilus* MC y 1 *Bifidobacterium longum*) y los autores observaron efectos muy variables y dependientes de la cepa usada. En este modelo animal, se observaron los efectos más notables para las cepas de lactobacilos analizadas. Además, los efectos observados son de tipo puramente inmunológico, y no están directamente relacionados con observaciones clínicas, sobre la sintomatología de tipo alérgico (Peng et al., 2007). También se debe tener en cuenta que todas las cepas probióticas no son compatibles con la alimentación infantil, por no ser el ácido D láctico metabolizable por los lactantes.

50 Terpend *et al.* han estudiado más específicamente las propiedades de una leche fermentada por *Bifidobacterium breve* y *Streptococcus thermophilus*. Los resultados de este estudio muestran un efecto de refuerzo de la barrera intestinal a las proteínas de la leche. Sin embargo, estos autores no han podido demostrar un efecto antialérgico directo de dicha leche fermentada (Terpend et al., 1999).

55 En este contexto, los inventores han desarrollado formulaciones adaptadas a la alimentación infantil, que solucionan al menos una parte de los inconvenientes de los productos descritos en la técnica anterior, lo que permite proponer un enfoque diferente en la toma de carga dietética por los niños con riesgo de alergia.

El enfoque elegido para proporcionar un beneficio consiste en regular directamente el establecimiento de la flora y del sistema inmunitario intestinal del niño, por medio de compuestos inmunomoduladores activos derivados de la

bioconversión o de la fermentación por una cepa de *Bifidobacterium*. Los resultados presentados en la parte experimental más adelante, demuestran beneficios directos sobre la sintomatología alérgica.

Por lo tanto, la presente invención se refiere, en primer lugar, al uso de una cepa de *Bifidobacterium* para la preparación de una composición destinada a la prevención y/o al tratamiento de manifestaciones de tipo alérgico. Según una realización preferida de la invención, la cepa de *Bifidobacterium* utilizada proviene de la flora intestinal humana. Más preferiblemente, esta cepa pertenece a la especie *Bifidobacterium breve*. Una cepa particularmente adecuada para la realización de la presente invención es la cepa BbC50, depositada el 31 de mayo de 1999 por la compañía Gervais Danone, en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), con el número I-2219.

Un procedimiento para la preparación de una composición destinada a la prevención y/o al tratamiento de manifestaciones alérgicas de acuerdo con la invención comprende, ventajosamente, una etapa de fermentación de un sustrato lácteo en presencia de la cepa de *Bifidobacterium*. Esta etapa de fermentación de un sustrato lácteo en presencia de la cepa de *Bifidobacterium* mencionada anteriormente se puede realizar en condiciones aerobias o anaerobias.

Por "sustrato lácteo" se entiende en la presente memoria un medio acuoso que comprende al menos una fracción de proteínas de lactosuero y lactosa. Si es necesario, las proteínas del lactosuero pueden estar hidrolizadas y/o enriquecidas en lactoalbúmina natural. El permeado del lactosuero puede estar integrado igualmente en el sustrato lácteo. Como ejemplos no limitantes de sustratos lácteos, cabe mencionar leche, un concentrado de leche, una base para alimentos lácteos infantiles, una base para yogur, etc. ...

En una realización preferida de la invención, el procedimiento para la preparación de una composición destinada a la prevención y/o al tratamiento de manifestaciones alérgicas de acuerdo con la invención comprende una etapa de bioconversión de un sustrato lácteo por la cepa de *Bifidobacterium* realizada en condiciones desfavorables para la producción de ácido por dicha cepa, como se describe en la solicitud WO 2001/001785. Esta bioconversión, que corresponde a una fermentación no acidificante o poco acidificante, permite igualmente la producción de metabolitos activos. Los detalles de las condiciones para esta fermentación particular se facilitan más adelante.

Las "condiciones desfavorables para la producción de ácido por *Bifidobacterium*" se definen como las condiciones bajo las cuales la acidificación del medio por *Bifidobacterium* no excede de 0,5 unidades de pH en 8 horas de incubación para una siembra inicial superior a 1×10^7 UFC por mL. Pueden ser determinadas fácilmente por una persona experta en la técnica usando ensayos sencillos, particularmente haciendo variar la aireación del medio de cultivo, su presión osmótica y/o la temperatura de cultivo, y midiendo el pH al principio y al final del cultivo.

Para un gran número de cepas de *Bifidobacterium*, dichas condiciones se pueden obtener particularmente por:

- el uso de una población bacteriana procedente de un inóculo en una etapa posterior a la fase exponencial de crecimiento;
 - el mantenimiento de condiciones aerobias, por ejemplo con agitación;
 - el mantenimiento del medio a una presión osmótica correspondiente a 0,93 a 0,97 de actividad del agua (AW);
 - el mantenimiento a una temperatura de 40 a 48°C
- así como combinaciones de estas diferentes condiciones.

En esta realización de la invención, la puesta en contacto del sustrato lácteo con las bifidobacterias se puede efectuar a razón de 10^7 a 10^9 UFC por mL de sustrato lácteo, y la población final de bifidobacterias al final de la reacción de bioconversión puede estar comprendida entre 10^5 y 10^9 UFC por mL de producto.

El pH del sustrato lácteo durante la puesta en contacto con las bacterias es preferiblemente de 6,0 a 7 y el pH del producto al final de la reacción de bioconversión es preferiblemente de 5,8 a 7.

Dependiendo de las condiciones utilizadas, el tiempo de contacto entre el sustrato lácteo y las bacterias para dicha etapa de bioconversión puede estar comprendido entre 4 y 24 horas.

Por supuesto, en un procedimiento de acuerdo con la invención, las etapas de bioconversión y de fermentación descritas anteriormente no son mutuamente excluyentes. Por ejemplo, dicho procedimiento puede comprender una etapa de bioconversión (poco o nada acidificante) de un sustrato lácteo por *Bifidobacterium* seguida de una etapa de fermentación acidificante por esta misma bacteria. Alternativamente, las dos reacciones se pueden llevar a cabo en paralelo, en dos sustratos lácteos distintos, combinándose luego los productos de las dos reacciones en la composición antialérgica final.

Dependiendo de la naturaleza de la composición antialérgica que se desea obtener, se pueden aplicar diferentes tratamientos adicionales al producto de la bioconversión y/o de la fermentación del sustrato lácteo por las bifidobacterias. En particular, se puede prever ventajosamente una etapa de esterilización y/o de separación de las bifidobacterias al final de la etapa de fermentación o de bioconversión, en particular para obtener productos de larga conservación. Así mismo, se pueden realizar diferentes etapas de filtración, deshidratación o cromatografía, dependiendo de la naturaleza de la composición final que se desee obtener.

Ejemplos de productos utilizables para la preparación de una composición destinada a la prevención y/o al tratamiento de manifestaciones alérgicas, de acuerdo con la presente invención, están descritos en particular en las solicitudes WO 2001/001785 (producto utilizado en el ejemplo 1 más adelante), WO 2004/093898 y WO 2004/093899 (ejemplo 2), y WO 2006/040485. Por supuesto, las mezclas de estos productos se pueden usar también de acuerdo con la invención.

Cuando sea apropiado, una composición obtenida por un procedimiento de la invención puede comprender, además del producto de la fermentación o bioconversión de un sustrato lácteo por una cepa de *Bifidobacterium*, una masa resultante de la fermentación de un sustrato lácteo por una cepa de *Streptococcus thermophilus*, por ejemplo, por la cepa ST065, depositada el 23 de agosto de 1995 por la compañía Gervais Danone, en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), con el número I-1620. Una composición obtenida según la presente invención puede contener ventajosamente una fracción obtenida por un procedimiento tal como el descrito en la solicitud WO 96/06924.

Según una realización preferida de la invención, la composición obtenida es un alicamento (o alimento funcional), es decir un alimento o ingrediente alimentario que tiene un beneficio para la salud, en este caso al nivel de la prevención o del tratamiento de manifestaciones alérgicas. A modo de ejemplo, la composición puede ser un producto lácteo fresco de tipo yogur, un plato cocinado, una salsa, etc. La composición puede ser también un producto de larga conservación, esterilizado y/o deshidratado.

Una composición obtenida según una realización preferida de la invención está destinada a la alimentación infantil. Por ejemplo, se puede tratar de una leche infantil (en forma deshidratada o no). Un ejemplo no limitativo de leche infantil obtenida de acuerdo con la presente invención es la leche comercializada con el nombre Gallia Calisma (1ª o 2ª edad) por el grupo Danone.

Es importante tener en cuenta que una composición obtenida según uno de los procedimientos anteriores o en el Ejemplo 2 más adelante puede ser incorporada, como ingrediente, en cualquier tipo de composición alimentaria. Por lo tanto, una composición alimentaria obtenida según la invención se podrá caracterizar por que contenga, como ingrediente, al menos una composición obtenida de acuerdo con uno de los procedimientos descritos anteriormente o en el Ejemplo 2 más adelante. Dichas composiciones alimentarias pueden estar destinadas a la alimentación humana o animal y, pueden presentarse particularmente en forma de una preparación láctea o no, fermentada o no, de origen animal o vegetal, incluidas particularmente las fórmulas infantiles o para adultos y personas mayores, y en particular en forma de una preparación láctea infantil, leche líquida o en polvo, productos frescos, cereales, galletas (forraje), potitos, postres, etc, o incluso en forma de productos alimentarios o dietéticos para adultos, incluidos productos para hospitales.

Alternativamente, una composición obtenida según la presente invención puede presentarse como un suplemento nutricional.

Según otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la prevención y/o al tratamiento de manifestaciones alérgicas. Una composición farmacéutica obtenida según la presente invención se caracterizará por que contenga, como principio activo, al menos una composición obtenida según uno de los procedimientos descritos anteriormente o en el Ejemplo 2 más adelante, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende cualquier vehículo que, si bien conserva sus propiedades en la composición obtenida de acuerdo con uno de los procedimientos descritos anteriormente o en el Ejemplo 2 siguiente, permite transportar dicha composición.

Un suplemento nutricional o una composición farmacéutica obtenida según la presente invención se puede presentar en cualquier forma galénica deseada para la administración por vía oral a seres humanos o animales, como por ejemplo en forma líquida para un jarabe o un solución, una pulverización o en forma sólida como, por ejemplo, un polvo, un comprimido, una cápsula de gelatina, una cápsula, un aerosol en polvo, una goma, una pasta, gránulos, en sus diversas formas, de liberación inmediata o programada, o bajo cualquier otra forma adecuada para administración por vía oral. Las composiciones farmacéuticas obtenidas de acuerdo con la presente invención se pueden formular también para una administración por vía tópica a seres humanos o animales, tales como, por ejemplo, en forma de una crema, una loción, un jabón, una solución, un gel, una leche, un aceite o para una administración por vía anal a seres humanos o animales, como por ejemplo en forma de un supositorio.

Las composiciones obtenidas por un procedimiento de acuerdo con la invención están destinadas preferiblemente a la alimentación humana y aportarán un beneficio a todas las personas que presentan una zona alérgica. Los individuos que presentan manifestaciones de tipo alérgico, así como los recién nacidos, lactantes o niños pequeños (de hasta 5 años) de los cuales al menos uno de los padres presenta una alergia y/o una zona atópica, constituyen una población a la que estas composiciones aportarán un gran beneficio. Los individuos que padecen alergias alimentarias, respiratorias o de contacto, así como los sujetos atópicos, podrán constatar también una mejora en su estado debido al consumo regular de una composición obtenida mediante un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

Los resultados del estudio presentado a continuación en los siguientes ejemplos muestran en particular que las preparaciones infantiles obtenidas de acuerdo con la invención permiten, por un lado, prevenir la aparición de una alergia a las proteínas de la leche de vaca (APLV) en cierto número niños con alto riesgo de alergia y, por otro lado, tratar las manifestaciones cutáneas de tipo alérgico en los lactantes. El uso de una cepa de *Bifidobacterium* para la preparación de una composición destinada a la prevención de la alergia a las proteínas de la leche de vaca y/o para la preparación de una composición destinada a la prevención y al tratamiento de manifestaciones cutáneas de tipo alérgico (eccema, descamación, grieta retroauricular, eritema, picazón ...) en lactantes, es por lo tanto una parte integrante de la invención.

La presente invención se entenderá mejor con la ayuda de la descripción adicional que sigue, que presenta los efectos antialérgicos de la leche infantil Gallia Calisma en lactantes que presentan zonas alérgicas. También se describen otras preparaciones que se pueden usar según la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efectos antialérgicos de la leche infantil Gallia Calisma

En un estudio prospectivo, longitudinal multicéntrico, aleatorizado, doble ciego con 2 grupos paralelos se integraron una preparación para lactantes (del tipo Calisma 1ª edad) y una leche de control (tipo Calisma 2ª edad). El procedimiento para preparar estas composiciones se muestra esquemáticamente en la figura 1.

El objetivo fue determinar la eficacia de una leche infantil bioconvertida (FF) en la prevención de la alergia a las proteínas de la leche de vaca (APLV), y la aparición de sensibilización a los alérgenos, en el recién nacido y el lactante, en comparación con una fórmula no bioconvertida (SF).

Para participar en este estudio se reclutaron niños con alto riesgo atópico. Las madres se reclutaron antes del 5º mes del embarazo con un seguimiento del niño hasta los 12 meses. La FF o SF se administró desde el nacimiento hasta 1 año o a partir del destete para los niños que fueron amamantados. El seguimiento dietético se realizó desde el 5º mes del embarazo y hasta 12 meses del niño con diversificación tardía según las recomendaciones actuales. Durante el seguimiento del niño durante su primer año, se recogieron las manifestaciones compatibles con una alergia alimentaria.

También se realizó un examen clínico sistemático a los 4 y 12 meses, así como *prick tests* (pruebas cutáneas que ponen de manifiesto la sensibilidad a un alérgeno determinado) a la leche de vaca (LV), soja, huevo, trigo, bacalao, cacahuete, *D. pteronyssinus*, *Alternaria*, gato, perro, polen de gramíneas y abedul. En caso de sospecha de APLV, se interrumpió toda la ingesta de proteínas de leche de vaca y se realizó un ensayo de provocación oral (TPO) a la LV.

Se incluyeron 129 niños, de los cuales 115 fueron controlados hasta 12 meses, de los cuales 59 consumieron FF y 56 SF. De 115 pacientes, 83 presentaron síntomas compatibles con una alergia alimentaria (72,2%). En el grupo FF, el porcentaje de manifestaciones digestivas y respiratorias observado es estadísticamente menor que el del grupo SF ($p < 0,05$). Estos resultados se presentan en las Figuras 2 y 3.

Además, de estos 115 niños, el 7% presentó una sensibilización a la leche (*Prick-Test* positivo), con una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos FF y SF (1,7% y 12,5% respectivamente) (Figura 4).

Este estudio demostró por primera vez el interés del uso de una fórmula bioconvertida para prevenir la aparición de manifestaciones de alergia alimentaria y la sensibilización a las proteínas de la leche de vaca.

La FF también se probó en el curso de un estudio prospectivo, longitudinal, multicéntrico, abierto que evalúa el interés de usar dicha fórmula en el tratamiento de la sintomatología cutánea menor.

Este estudio evaluó el efecto de una fórmula bioconvertida específica (Calisma), en comparación con una leche estándar midiendo la evolución de manifestaciones cutáneas menores en lactantes, después de reemplazar la leche estándar por la fórmula fermentada.

Se reclutaron lactantes con buena salud, de menos de 4 meses, que presentaban manifestaciones cutáneas de tipo alérgico correspondientes a un primer episodio sintomático. Las manifestaciones cutáneas observadas fueron las siguientes: descamación, grieta retroauricular, eritema, picazón.

Después de un mes de consumo de la fórmula bioconvertida, un pediatra y los padres evaluaron la evolución de estas manifestaciones cutáneas menores (naturaleza, localización e intensidad).

Se incluyeron 35 niños en el estudio. Después de 1 mes de consumo de la fórmula bioconvertida, se observó una evolución favorable de las manifestaciones en el 94% de los niños, incluida una desaparición completa de los síntomas en el 71% (Figura 5).

Estos resultados muestran la eficacia del producto en el tratamiento de las manifestaciones de naturaleza alérgica.

Ejemplo 2: Preparación de otras composiciones antialérgicas

Se pueden obtener otras composiciones antialérgicas por un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

a- siembra e incubación, en condiciones aerobias o anaerobias y a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30 y 40°C, de *Bifidobacterium* que comprende al menos la cepa *Bifidobacterium breve* I-2219 en un sustrato acuoso que presenta un pH comprendido entre aproximadamente 6 y 8, y que comprende al menos los siguientes ingredientes:

- i) permeado de lactosuero,
- ii) un hidrolizado de proteínas de lactosuero
- iii) lactosa

b- eliminación de las *Bifidobacterium* del sustrato acuoso;

c- ultrafiltración del sustrato acuoso sobre membranas de filtración que tienen un umbral de corte comprendido entre 100 y 300 kDa para obtener un retenido concentrado;

completado, cuando sea necesario con las etapas d- y e- siguientes:

d- deshidratación del retenido concentrado;

e- disolución del retenido deshidratado en un tampón.

Finalmente, se pueden efectuar las siguientes etapas f- y g- para obtener fracciones activas del retenido:

f- cromatografía de exclusión sobre gel en una columna, que presenta un umbral de exclusión de 600 kDa, de la solución del retenido;

g- recuperación de la fracción excluida y/o de la fracción filtrada al final de la cromatografía.

Más específicamente, se pueden obtener los productos utilizando el protocolo descrito a continuación.

Se prepara un medio de cultivo que contiene los siguientes ingredientes:

- 50 g/L de permeado de lactosuero,
- 10 g/L de hidrolizado de proteínas de lactosuero,
- 20 g/L de lactosa
- 2 g/L de extracto de levadura,
- 2,5 g/L de dihidrógenofosfato de potasio,
- 0,3 g/L de hidrocloreuro de cisteína
- 0,3 g/L de NaOH.

El medio de cultivo se ultrafiltra en casetes Centramate® vendidos por la sociedad PALL, equipados con membranas de polietersulfona que tienen un umbral de corte de 300 kDa y el permeado se esteriliza en autoclave durante 30 minutos a 120°C. El pH del medio de cultivo se ajusta luego a un valor de 6,5 usando una solución de amoníaco diluida a la mitad.

El medio de cultivo se siembra luego con bifidobacterias a razón de 6 % (v/v) de un concentrado congelado de la cepa de *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 que contiene $1,1 \cdot 10^{11}$ UFC de bifidobacterias por mL de concentrado congelado. La población inicial de bacterias es $3 \cdot 10^8$ UFC de bifidobacterias por mL de medio de cultivo. Las bifidobacterias se cultivan anaeróticamente, a una temperatura comprendida entre 35 y 40°C. Durante el cultivo, el pH del medio de cultivo se regula a 6,5 por medio de una solución de amoníaco diluida a la mitad. El tiempo de cultivo es 15 horas, y la población de *Bifidobacterium* al final del cultivo es aproximadamente $2 \cdot 10^7$ UFC por mL de medio de cultivo.

Al final del cultivo, las bacterias se eliminan del medio de cultivo fermentado por centrifugación durante 1 hora a 3000 g. Las actividades enzimáticas residuales contenidas en el líquido sobrenadante de centrifugación se destruyen por un tratamiento térmico de 3 minutos a 75°C.

El líquido sobrenadante se ultrafiltra en casetes Centramate® vendidos por la sociedad PALL, equipados con membranas de polietersulfona que tienen un umbral de corte de 300 kDa a una temperatura de aproximadamente 40° C. Así, se concentra 3 veces, luego se lava 3 veces con agua permutada. Durante el último lavado, se opera a una concentración de 7 veces la parte retenida por la membrana. Se obtiene así un concentrado llamado retenido. El retenido se deshidrata por liofilización y luego se recoge en un tampón Tris-NaCl a pH 8.

El retenido concentrado, previamente recogido en un tampón Tris-NaCl pH 8, se somete a cromatografía preparatoria. La separación se lleva a cabo por cromatografía en una columna de gel Superdex® 200 vendida por la sociedad Amersham Biosciences de 50 mm de diámetro y 100 cm de altura, alimentada con un caudal de 5 mL por minuto y que presenta un umbral de exclusión de 600 kDa. Las fracciones se recogen en 10 mL y su absorbancia se mide a 280 nanómetros.

Así se separan dos fracciones:

- una fracción excluida del gel con un peso molecular superior a 600 kDa (tiempo de retención 130 a 180 minutos +/- 10%),
- una fracción filtrada de peso molecular comprendido entre 200 y 600 kDa (tiempo de retención 187 a 370 minutos +/- 10%).

La fracción excluida se dializa contra agua destilada y luego se diluye para volver a la concentración del retenido. Esta fracción se puede conservar luego en forma congelada o liofilizada. La fracción filtrada también se puede conservar de la misma manera.

- 5 El retenido o una cualquiera de las fracciones separadas por cromatografía, así como sus mezclas, pueden ser usado para prevenir, atenuar o tratar manifestaciones de tipo alérgico.

Referencias

- Host, A., and Halken, S. (2005). Primary prevention of food allergy in infants who are at risk. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5, 255-259.
- 10 Host, A., Koletzko, B., Dreborg, S., Muraro, A., Wahn, U., Aggett, P., Bresson, J. L., Hernell, O., Lafeber, H., Michaelsen, K. F., et al. (1999). Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. Joint Statement of the European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI) Committee on Hypoallergenic Formulas and the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *Arch Dis Child* 81, 80-84.
- 15 Johansson, S. G., Hourihane, J. O., Bousquet, J., Brujnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M. L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., et al. (2001). A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56, 813-824.
- Kalliomaki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S., and Isolauri, E. (2001). Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 107, 129-134.
- 20 Osborn, D. A., and Sinn, J. (2006a). Formulas containing hydrolysed protein for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003664.
- Osborn, D. A., and Sinn, J. (2006b). Soy formula for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003741.
- Peng, S., Lin, J. Y., and Lin, M. Y. (2007). Antiallergic effect of milk fermented with lactic acid bacteria in a murine animal model. *J Agric Food Chem* 55, 5092-5096.
- 25 Prescott, S. L., Dunstan, J. A., Hale, J., Breckler, L., Lehmann, H., Weston, S., and Richmond, P. (2005). Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma responses in very young children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 35, 1557-1564.
- 30 Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., and Koga, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 159, 1739-1745.
- Terpend, K., Blaton, M. A., Candalh, C., Wal, J. M., Pochart, P., and Heyman, M. (1999). Intestinal barrier function and cow's milk sensitization in guinea pigs fed milk or fermented milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28, 191-198.

REIVINDICACIONES

1. Composición obtenida por un procedimiento que comprende una etapa de bioconversión de un sustrato lácteo utilizando un cultivo de una cepa de *Bifidobacterium breve*, por mantenimiento de dicho sustrato en contacto con dicho cultivo, en condiciones desfavorables para la producción de ácido por dicha cepa de *Bifidobacterium*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de manifestaciones de tipo alérgico en niños, estando dicha composición destinada a prevenir y/o tratar una alergia a las proteínas de la leche de vaca,
5
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada por que la cepa de *Bifidobacterium breve* es la cepa BBC50, depositada el 31 de mayo de 1999 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), con el número I-2219.
3. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada por que su procedimiento de preparación comprende además una etapa de fermentación de un sustrato lácteo en presencia de dicha cepa de *Bifidobacterium*.
10
4. Composición para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que su procedimiento de preparación comprende una etapa de esterilización y/o de separación de dichas bifidobacterias al final de la etapa de fermentación o de bioconversión.
15
5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende además una masa resultante de la fermentación de un sustrato lácteo por una cepa de *Streptococcus thermophilus*.
6. Composición para su uso según la reivindicación 5, en la que dicha cepa de *Streptococcus thermophilus* es la cepa ST065, depositada el 23 de agosto de 1995 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), con el número I-1620.
20
7. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que se trata de un alicamento, un complemento alimentario o una composición farmacéutica.
8. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que está destinada a individuos que presentan manifestaciones de tipo alérgico, a sujetos atópicos o a niños de los cuales al menos uno de los padres presenta una alergia y/o una zona atópica.
25
9. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que está destinada a lactantes que presentan manifestaciones cutáneas de tipo alérgico.

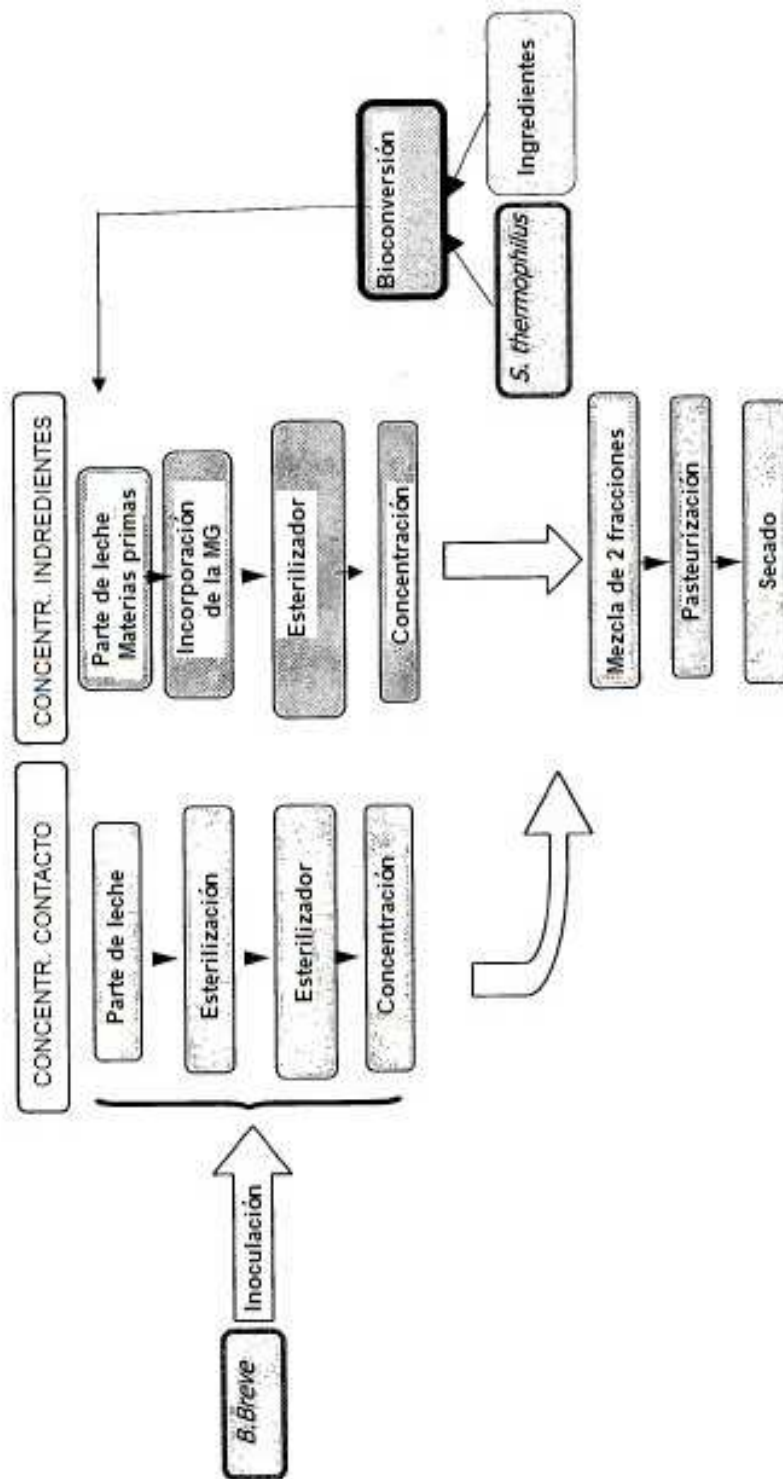


Figura 1

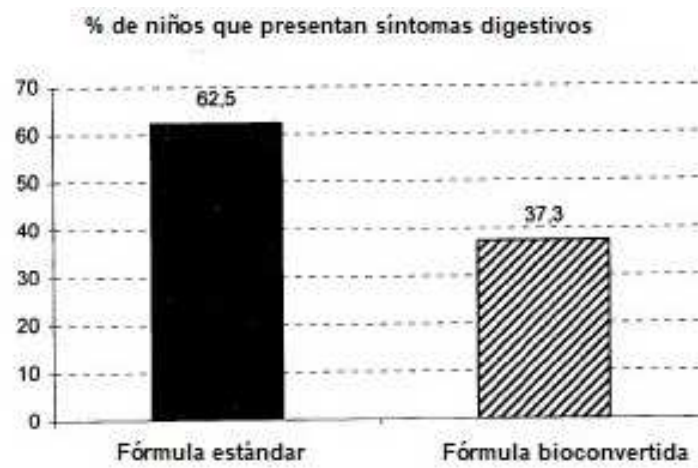


Figura 2

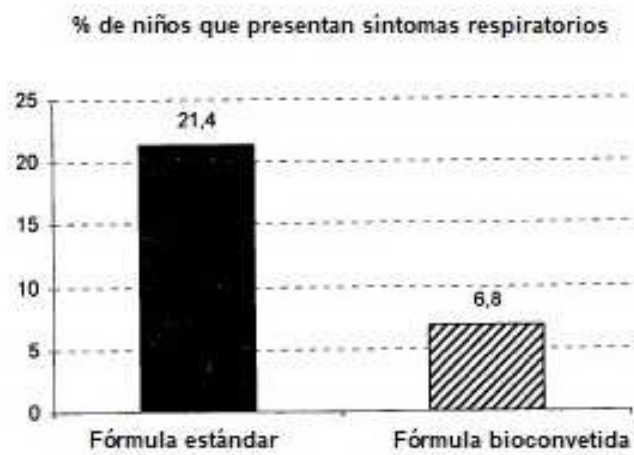


Figura 3

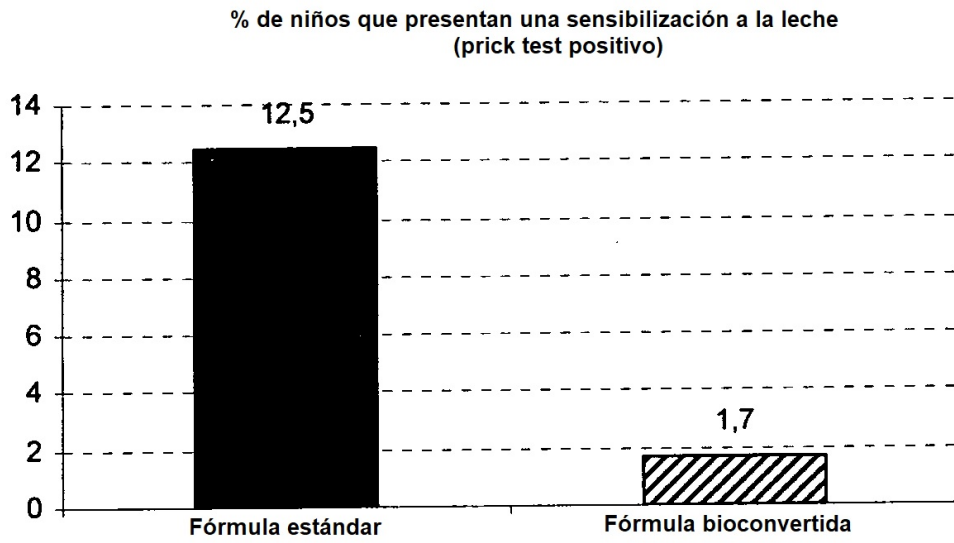


Figura 4

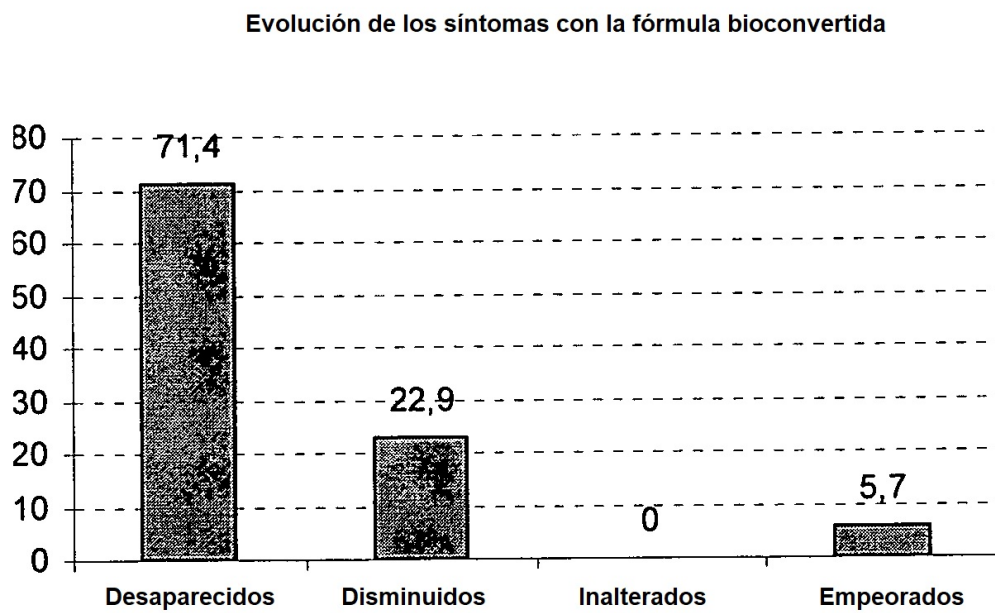


Figura 5