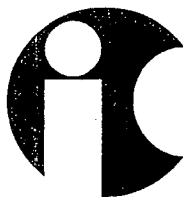




No. 14-198811- -00000-0000

Fecha: 2014-09-09 14:13:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 42



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO MATERIAL NO VIABLE DERIVADO DE UN PROBIÓTICO PARA LA PREVENCIÓN
Y EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A23L 1/30; A61K 35/74; C12R 1/225

71. SOLICITANTE MJN U.S. HOLDINGS LLC

DOMICILIO 2701 Patriot Boulevard, 4th Floor Estado de Illinois E.U.A.

74. APODERADO GERMAN CASTILLO GRAU

22. BOGOTÁ, D.C., 2014

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II	
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)			
Solicitud Internacional No.		PCT/US2013/032757	Fecha Marzo 18, 2013	
Publicación Internacional No.		WO 2013/142403 A1	Fecha Septiembre 26, 2013	
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)			
MATERIAL NO VIABLE DERIVADO DE UN PROBIÓTICO PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN				
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)			
A23L 1/30; A61K 35/74; C12R 1/225				
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO	
1 MJN U.S. HOLDINGS LLC				
6	DATOS DEL SOLICITANTE			
DIRECCIÓN 2701 Patriot Boulevard, 4th Floor		No. TELÉFONO		
CIUDAD Glenview		CORREO ELECTRÓNICO		
DEPARTAMENTO/ESTADO Estado de Illinois		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN E.U.A.		
PAÍS DE RESIDENCIA E.U.A.				
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD	
1. Van Tol		Eric A.F.	Países Bajos	
2. Gross		Gabriele	Países Bajos	
3 Braaksma		Machtelt	Países Bajos	
4. Overkamp		Karin M.	Países Bajos	
5 Poels		Eduard K.	E.U.A.	
6.				
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:				
8	DATOS INVENTOR (ES)			
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN	
1. Países Bajos		Indiana	Arnhem	Roemer Visscherstraat 62, 6824MZ
2. Países Bajos			Nijmegen	Mesdagstraat 46, 6521MR
3. Países Bajos			Utrecht	Detmoldstraat 78-II, 3523GG
4. Países Bajos			Utrecht	Operettelaan 349, 3543BR
5. E.U.A.			Newburgh	1766 Olde Mill Ct.
6.				
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)				
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.				
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO			
GERMAN CASTILLO GRAU		IDENTIFICACIÓN		
		C.C.17.017.671 T.P.2.978 C.S.J. Bogotá		
DIRECCIÓN Carrera 13 No. 37-43 Piso 12		No. TELÉFONO 2857460		
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO info@castillograu.com		
PAÍS Colombia		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL		

10

DECLARACIONES DE PRIORIDAD

X SI

☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. EP		12161083.6	Marzo 23, 2012
2.			
3.			

11

DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI

X NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12

DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI

X NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13

REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI

X NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas

☐

Universidades públicas o privadas

☐

Entidades sin ánimo de lucro

☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14

AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA

☐ SI

X NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15

COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO

N°

Fecha

16

FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

GERMAN CASTILLO GRAU

17

ANEXOS

Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. X Descripción N° de folios: 2. X Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 3. Dibujos y/o figuras N° folios: 4. X Resumen. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. X Poderes, si fuera el caso, copia 10. X Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.
--	--

3

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☒ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT	
(21) No. De solicitud	(51) int. Cl: A23L 1/30; A61K 35/74; C12R 1/225	
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) MJN U.S. HOLDINGS LLC	
30) Prioridad SI (31) No. Prioridad 12161083.6 (32) Fecha: Marzo 23, 2012	(72) Interventor (es) Eric A.F. Van Tol; Gabriele Gross; Machtelt Braaksma; Karin M. Overkamp; Eduard K. Poels	
(33) Pais EP	(74) Apoderado (s) GERMAN CASTILLO GRAU	
(54) Título MATERIAL NO VIABLE DERIVADO DE UN PROBIÓTICO PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN		
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT		
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional		
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud Fecha Marzo 18, 2013 No. de solicitud PCT PCT/US2013/032757	(87) Publicación internacional Fecha Septiembre 26, 2013 No. Publicación WO 2013/142403 A1	
Resumen reivindicación (es): Una composición que comprende un sobrenadante del cultivo de una fase de crecimiento exponencial tardío de un proceso de cultivo por lotes para un probiótico como LGG, para usar en el tratamiento o la prevención de la infección por un patógeno como <i>C. sakazakii</i>		



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MAY 22, 2013

PTAS

JAMES R. CARTIGLIA
1600 DIVISION ST., SUITE 500
NASHVILLE, TN 37203

502354266

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 05/21/2013

REEL/FRAME: 030454/0181
NUMBER OF PAGES: 9

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: MJE00345NP

ASSIGNOR:

VAN TOL, ERIC A.F.

DOC DATE: 04/03/2013

ASSIGNOR:

GROSS, GABRIELE

DOC DATE: 05/16/2013

ASSIGNOR:

BRAAKSMA, MACHTELT

DOC DATE: 04/02/2013

ASSIGNOR:

OVERKAMP, KARIN M.

DOC DATE: 04/02/2013

ASSIGNOR:

POELS, EDUARD K.

DOC DATE: 03/28/2013

ASSIGNEE:

MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY
2701 PATRIOT BLVD., 4TH FLOOR
GLENVIEW, ILLINOIS 60026

6

APPLICATION NUMBER: 13832828

FILING DATE: 03/15/2013

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: PROBIOTIC DERIVED NON-VIABLE MATERIAL FOR INFECTION PREVENTION
AND TREATMENT

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

In consideration of the payment of one (\$1.00) dollar, and for other good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Eric A.F. van Tol, Gabriele Gross, Machtelt Braaksma, Karin M. Overkamp and Eduard K. Poels ("Assignors") assign to Mead Johnson Nutrition Company of Glenview, IL ("Assignee") their entire right, title, and interest in and to an invention entitled "PROBIOTIC DERIVED NON-VIABLE MATERIAL FOR INFECTION PREVENTION AND TREATMENT" (the "Invention"), and in any and all patents, reissue patents, certificates of inventorship, design registrations, utility models, and the like, that may be granted in the U.S. or in any foreign country with respect to the Invention and improvements thereto and in any application, including continuations, continuations-in-part, or divisions, that may be filed with respect to the Invention, or improvements thereto, including U.S. Patent App. No. 13/832,828, filed 3/15/2013.

Assignors represent and warrant that they have not transferred, licensed, and/or assigned any interest in the Invention to anyone other than Assignee, and that they have not entered into any contract, assignment, or license conveying any right granted to Assignee hereunder, or that would otherwise conflict with this Assignment.

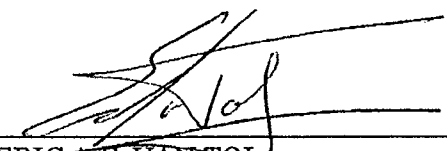
Assignors represent and warrant that they have not publicly used or disclosed the Invention and they have not previously sold or offered to sell the Invention.

Assignors will, without additional charge to Assignee but at Assignee's expense, cooperate with and assist Assignee such that Assignee may realize and fully enjoy all the rights assigned hereunder, including the preparation and execution of all papers

needed by Assignee, and providing such information and assistance as may reasonably be required by Assignee in any administrative or legal proceeding to obtain or protect such rights.

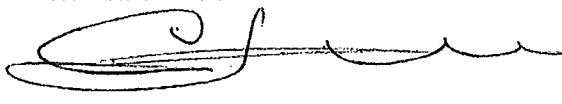
This Assignment and each of its terms shall be binding on each Assignor, and his/her representatives, heirs and assigns, and shall inure to the benefit of Assignee, its successors, and assigns.

6

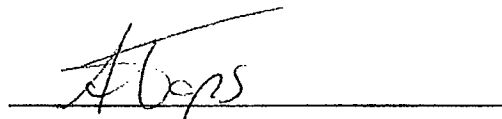

ERIC A.F. VANTOL

April 3rd, 2013
Date

WITNESSES:



Name: C. Boone
Date: April 3rd, 2013



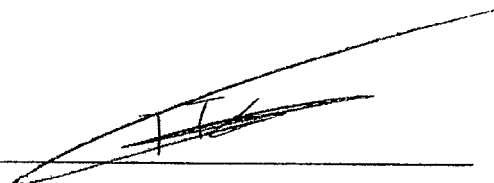
Name: A. Tops
Date: April 3rd, 2013

Gabriele Gross
GABRIELE GROSS

16 May, 2013
Date

WITNESSES:


Name: E.A.F. VAN Tol
Date: 16 MAY 2013


Name: T.T. Lambers
Date: 16 -05-2013

10

M. Braaksma
MACHTELT BRAAKSMA

April 2, 2013
Date

WITNESSES:

[Signature]
Name: P. de Boer
Date: April 2, 2013

K.M. Overkamp
Name: K.M. Overkamp
Date: April 2, 2013

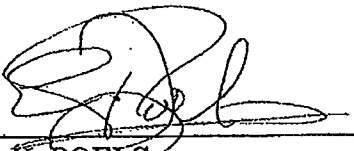
KM Overkamp
KARIN M. OVERKAMP

April 2, 2013
Date

WITNESSES:

[Signature]
Name: P. de Boer
Date: April 2, 2013

[Signature]
Name: M. Braaksma
Date: April 2, 2013


EDUARD K. POELS

Date

03-28-2013

STATE OF

Maryland

COUNTY OF

Howard

Before me, Kimberly Sauter-Bray a Notary Public of the state and county aforesaid, personally appeared EDUARD K. POELS, with whom I am personally acquainted, or proved to me on the basis of satisfactory evidence, and who upon oath, acknowledged that he is the within named Assignor, and that he executed the foregoing instrument for the purposes therein contained.

This 28 day of mar, 2013.

Kimberly A. Sauter-Bray
Notary Public

My commission expires: 8-7-14

KIMBERLY A. SAUTER-BRAY
Notary Public
Baltimore Co., MD
My Comm. Exps. 8-7-14

Castillo Grau & Associates

Law Offices

P.O. Box 251473

Bogotá, Colombia

FOR PATENTS AND TRADEMARKS IN

COLOMBIA

PODER GENERAL

(1) MJN U.S. HOLDINGS LLC

domiciliado en 2701 Patriot Boulevard, 4th Floor,
Glenview, Estado de Illinois, E.U.A.

nombra al Dr. Germán Castillo Grau y/o Adriana
Castillo Gibsone y/o Luis Felipe Castillo Gibsone

con oficinas en la Carrera 13 No. 37-43, Piso 12
en Bogotá, D.C., Colombia como sus
representantes con poder especial amplio y
suficiente, para recabar de las oficinas y
autoridades Colombianas, administrativas,
judiciales o de policía, en primera o segunda
instancia, la Obtención de Patentes de
Invención, Registro de Marcas, de Diseños
Industriales, de Nombres y Enseñas
Comerciales, lo mismo que traspasos,
extensiones, renovaciones, cambios de nombre
y domicilio, registro de licencias de explotación y
registro de licencias de uso referentes a tales
actuaciones, a cuyo efecto les faculta para dar
ante dichas autoridades todos los pasos
necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes,
formular descripciones, enmiendas, protestas,
declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar
la aplicación de medidas cautelares, aceptar en
nuestro nombre y representación la Cesión de
derechos de invención y de patente de invención
que se nos haga por cualquier persona, abonar
todos los impuestos cuotas y pagos
determinados por la ley, recibir todos los
documentos y valores dando el descargo
respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos,
desistir, y tomar en fin todas las medidas que
creyeren conducentes al resguardo de nuestros
intereses y en caso de presentarse oposiciones
para que intervengan como demandantes o
como demandados, con todas las demás
facultades legales necesarias. Este poder
comprende además las facultades de recibir,
desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar
sustituciones, recibir notificaciones y nombrar
apoderados judiciales o extra-judiciales.

Dado y firmado en

Firma/Signature

Kofi B. Kwarteng, Assistant Secretary

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(1) MJN U.S. HOLDINGS LLC

domiciled in 2701 Patriot Boulevard, 4th Floor,
Glenview, Illinois, U.S.A.

hereby appoint Dr. Germán Castillo Grau and/or
Adriana Castillo-Gibsone and/or Luis Felipe
Castillo-Gibsone

with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in
Bogotá, Colombia as our representatives with
special ample and sufficient power to obtain from
the offices and Colombian authorities,
administrative, judicial and police, in first or in
second instance, Patents of Invention,
registration of Trade or Service Marks, Industrial
Designs, of Commercial Names and Ensigns, as
well as assignments, extensions, renewals,
changes of names and addresses, registration of
licences of exploitation and licences of use
referring to said actions who are empowered to
take before said authorities all of the necessary
steps for the purposes indicated, to file
applications, to formulate descriptions,
corrections, protests, declarations, appeals and
claims, apply for precautionary measures, to
accept on our behalf and representation the
assignment of rights on invention and titles of
invention that may be given to us by any person,
to pay all taxes, quotas and payments
prescribed by law, to receive all the documents
and proceeds giving the respective
acquiescence or receipt, to fulfill any other
requisites to desist and take in fact any other
measures that may be deemed conducive to the
safeguard of our interests, and in case
oppositions are presented to intervene as
plaintiff or defendant, with all necessary legal
faculties. This power includes the faculties to
receive, desist, compromise, transact, substitute
it in all or in part, to revoke substitutions, to
receive notifications and to appoint judicial or
extra-judicial attorneys.

Given and signed in
GLENVIEW, ILLINOIS
August 6, 2013

DESCRIPCIÓN

MATERIAL NO VIABLE DERIVADO DE UN PROBIÓTICO PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN

CAMPO TÉCNICO

[0002] La revelación pertenece a un método de cosechar materiales no viables biológicamente activos de una cepa bacteriana probiótica, especialmente el *Lactobacillus rhamnosus* Goldin Gorbach (LGG). En particular, la revelación pertenece a un proceso para la preparación de un material derivado del probiótico activo contra la infección bacteriana, el cual material probiótico se puede obtener por el método de cosecha revelado, y a productos dietéticos o nutricionales que incluyen el material derivado del probiótico.

ANTECEDENTES

[0003] El *Cronobacter sakazakii* (*Cronobacter sakazakii*, anteriormente designado como *Enterobacter sakazakii*) es un patógeno oportunista que ha sido asociado con brotes de infección en bebés, sobre todo en unidades de cuidados intensivos neonatales. En bebés puede causar bacteremia, meningitis y enterocolitis necrotizante (NEC). La tasa de mortalidad infantil debida a la infección por este organismo se ha informado en 40-80%. A consecuencia de invasión bacteriana del cerebro, las infecciones a menudo conducen a retardo del desarrollo y deterioro de la función cognitiva. Hasta 20% neonatos que sobreviven desarrollan serias complicaciones neurológicas.

[0004] De aquí que exista el deseo de proporcionar una composición que ofrezca protección o que pueda tratar la infección de patógenos como el *C. sakazakii*. La presente revelación proporciona una composición que tiene un efecto sobre la invasión de patógenos como *C. sakazakii* dentro del cerebro y sobre la mortalidad en un modelo de ratas neonatales. Se ha encontrado que el sobrenadante de un cultivo de LGG reduce la invasión por *C. sakazakii* al cerebro y el hígado e incluso inhibe completamente la mortalidad relacionada con el *C. sakazakii* de las ratas recién nacidas.

[0005] En este contexto, se han examinado varios compuestos para determinar sus propiedades inhibitorias sobre la adherencia o el crecimiento bacteriano del *C. sakazakii* *in vitro*. Por ejemplo, se ha demostrado que los oligosacáridos prebióticos inhiben la adherencia del *C. sakazakii* a las células epiteliales en un cultivo celular (Quintero et al., Curr. Microbiol. 62(5):1448-54). Se ha descrito que los péptidos antimicrobianos derivados de la caseína generados por el *Lactobacillus acidophilus* ejercen actividad antibacteriana contra *C. sakazakii* y *E. coli* en un ensayo de difusión (Hayes et al, 2006 Appl. Environ. Microbiol. vol. 72 no. 3; 2260-2264).

Collado et al (2008 FEMS Microbiol Lett 285 58-64) examinaron cepas de probióticos para contrarrestar la adhesión de *C. sakazakii* al moco humano aislado (LGG no se incluyó en este estudio). Se ha usado el sacárido del ácido urónico para inhibir el crecimiento del *C. sakazakii* en medio de cultivo (WO2009/148312). En resumen, muchos de estos compuestos tienen características y composiciones muy diferentes en comparación con el material sobrenadante del LGG. Además, todas estas sustancias han sido examinadas *in vitro* y se han centrado en aspectos seleccionados que contribuyen al desarrollo de la infección como la inhibición del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo o la inhibición de la adherencia bacteriana a las células epiteliales. Si bien aspectos como adhesión y crecimiento bacterianos pueden contribuir al desarrollo de la infección, estos ensayos *in vitro* no son estrictamente predictivos de los efectos sobre los parámetros de la infección sistémica corriente abajo y los desenlaces clínicos *in vivo*. Excepto el *L. bulgaricus* (que se especifica más adelante), las sustancias enumeradas arriba no han sido probadas *in vivo* todavía y por ello hasta el momento no se ha demostrado que se los efectos protectores sugeridos puedan alcanzarse *in vivo*.

[0006] En lo que respecta a los probióticos o sus sobrenadantes, se ha demostrado que previenen la adhesión de los patógenos (incluido el *C. sakazakii*) a las células epiteliales o el moco humano *in vitro* o que inhiben el crecimiento de los patógenos *in vitro*. Por ejemplo, Sherman et al. (Infect. Immun. 2005 5183-5188) han demostrado que los probióticos reducen los cambios inducidos por EHEC y ETEC en las células epiteliales T84 *in vitro*, pero que los sobrenadantes del cultivo y bacterias tyndalizadas (sometidas a tratamiento con calor o irradiación gamma) no tuvieron el efecto correspondiente. Hudeault et al (Appl. Environ. Microbiol 1997 513-518) han demostrado que tanto el *Lactobacillus* GG (LGG) como su sobrenadante del cultivo gastado redujeron la invasión por *Salmonella typhimurio* *in vitro*, aunque en menor grado. Solamente los microorganismos LGG vivos fueron examinados en el modelo murino correspondiente de infección por *S. typhimurio* *in vivo*. De Keersmaecker et al. (FEMS Microbiol Lett 2006 259 89-96) caracterizaron la actividad antimicrobiana de sobrenadante LGG contra *Salmonella typhimurio* *in vitro*. EP1384483 revela que los ratones infectados con *Trichinella spiralis* tratados con *Bifidobacterium lactis* tuvieron un recuento de gusanos menor que los ratones tratados con medio de cultivo MRS. Más aún, otras cepas de probióticos como, p.ej., *L. acidophilus* tuvieron efectos diferenciales y aumentaron o no afectaron la carga de gusanos. Es importante anotar que los hallazgos de estudios con otros patógenos no se pueden traducir automáticamente al *C. sakazakii* por cuanto los mecanismos patogénicos difieren en grado significativo. Más

específicamente, el *C. sakazakii* puede invadir el cerebro y causarle daños, lo cual no sucede con las infecciones gastrointestinales comunes.

[0007] Para centrarse aún más en el papel de los probióticos y sus sobrenadantes, los probióticos se definen actualmente en el estado de la técnica como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del huésped. No obstante, la naturaleza viviente de los probióticos da lugar a desafíos cuando se los incorpora a los productos nutricionales. Estos desafíos pueden diferir en orden de magnitud dependiendo, entre otras cosas, del tipo de cepa de probióticos utilizada, el estado de salud del individuo que recibe el producto, o ambos. También desde el punto de vista de la tecnología de procesos, se tienen que superar considerables obstáculos cuando se incorporan microorganismos vivientes a los productos. Esto desempeña un papel particular si uno desea incorporar probióticos a productos de larga duración, p.ej., productos en polvo como sucedáneo de la leche materna para bebé. Así mismo, los desafíos aumentan con la creciente complejidad de las matrices de productos nutricionales.

[0008] Por otra parte, especialmente en el caso de productos dietéticos para bebés y niños, existe una importante demanda para los efectos beneficiosos de los probióticos. Más aún, asegurar la estabilidad y vitalidad de bacterias viables en productos nutricionales que se encuentran disponibles en canales minoristas u hospitalarios y expuestos a temperaturas ambientes supone un reto particular. El uso de productos bacterianos, a través de la aplicación de sobrenadantes del cultivo a este respecto proporcionaría considerables ventajas.

[0009] Como se mencionó arriba, muchos estudios que demuestran un efecto beneficioso incluyen solamente cultivos o ensayos *in vitro* que no pueden predecir directamente los desenlaces *in vivo*. Además, los sobrenadantes de cultivo de los probióticos no necesariamente ejercen los mismos efectos beneficiosos de las células bacterianas vivas del probiótico dado que los mecanismos subyacentes pueden diferir en grado considerable. Por ejemplo, el estudio de Sherman et al. (Infect. Immun. 2005 5183-5188) demostró que los probióticos reducen cambios inducidos por EHEC y ETEC en células epiteliales T84 *in vitro*, pero que los sobrenadantes del cultivo y las bacterias tyndalizadas no tuvieron el efecto correspondiente. Además, incluso cepas bacterianas estrechamente emparentadas pueden variar en sus características, dando lugar a diferentes propiedades de las cepas del probiótico así como de las cepas patogénicas. Un hallazgo relacionado con una cepa de probiótico seleccionada no se puede traducir directamente como un beneficio de otra cepa de probióticos. Esto fue demostrado por Gueimonde et al (Alimento Res. Internat. 39 2006 467-471), al mostrar que la capacidad de inhibir la adhesión de los patógenos (incluido el *E. sakazakii*) varía en alto grado entre los lactobacilos y los patógenos y que existe la

necesidad de una valoración caso por caso con el fin de seleccionar cepas que tengan la capacidad inhibir patógenos específicos. Además, Gross et al. (Beneficial Microbes 2010 1(1), 61-66) ilustraron la especificidad de cepa de probióticos característicos y demostraron que diferentes cepas de probióticos del mismo genus pueden diferir en sus propiedades probióticas. Por tal razón, no es posible concluir de los estudios que usan ciertas cepas de probióticos y bacterias viables en vez de sobrenadante que se pueden esperar los mismos efectos de otras cepas de probióticos y su sobrenadante derivado.

[0010] En lo que respecta a los efectos específicos de LGG (sobrenadante) y adhesión del patógeno a las células epiteliales o crecimiento bacteriano, hasta el momento las evidencias son contradictorias. Silva et al. (Antimicrobial Agents Chemotherapy Vol 31, no 8, 1987, 1231-1233) han demostrado actividad inhibitoria del sobrenadante de LGG contra una gama de especies bacterianas, entre las cuales no se menciona el *C. sakazakii*. En contraposición, en un estudio de Johnson-Henry et al. (Infect. Immun. 2008 Vol 76, no 4, 1340-1348), el sobrenadante de LGG no afectó el crecimiento de *E. coli* O157:H7 *in vitro*. Ruas-Madiedo et al. (J. Alimento Protec. Vol 69, no 8, 2006, 2011-2015) han informado que fracciones de exopolisacárido (EPS) de la superficie celular de diferentes bacterias probióticas incluido el LGG incluso aumentaron la adhesión de los patógenos como el *C. sakazakii* al moco intestinal humano *in vitro*. Por último, Roselli et al. (Br. J. Nutr. 2006 95 1177-1184) demostraron que el sobrenadante de LGG redujo la adhesión de *E. coli* a células Caco-2 y la migración de los neutrófilos inducida por ETEC, pero no afectó la viabilidad del *E. coli*. Así las cosas, los efectos de sobrenadante LGG específicamente preparado sobre los desenlaces relacionados con el *C. sakazakii in vivo* no puede ser previsto a partir de la bibliografía actual.

[0011] La única referencia a un estudio que usa lactobacilos probióticos contra los efectos relacionados con el *C. sakazakii in vivo* de la que tengamos noticia ha sido la de Hunter et al. (Infect. Immun. 2009 1031-1043). Estos autores han demostrado que el *Lactobacillus bulgaricus* previene la lesión de la célula epitelial intestinal causada por óxido nítrico inducido por *C. sakazakii* en una modelo de rata recién nacida NEC. El estudio mostró que el pretratamiento con organismos probióticos *L. bulgaricus* antes de la infección con *C. sakazakii* preserva la integridad del enterocito tanto *in vitro* como *in vivo*. No obstante, el tratamiento con *L. bulgaricus* junto con *C. sakazakii* no fue protector. Si bien este estudio indica algunos efectos prometedores de las células bacterianas viables de *L. bulgaricus* contra la infección por *C. sakazakii* en relación con la lesión de la célula epitelial intestinal en un modelo NEC, los resultados se refieren a una cepa diferente de probióticos (*L.*

bulgaricus en vez de LGG), diferente material (microorganismos probióticos viables en vez de sobrenadante) y diferentes parámetros de estudio (lesión de la célula epitelial intestinal en vez de invasión de órganos extraintestinales como el cerebro) en comparación con la presente revelación.

[0012] En resumen, los resultados de estudios previos con bacterias probióticas sobre la inhibición de los patógenos varían en alto grado. En algunos estudios, los microorganismos vivos ejercen un efecto beneficioso, pero se ha demostrado que este efecto no siempre puede ser reproducido por sobrenadantes del medio de cultivo. La mayoría de la evidencia con respecto a adhesión e inhibición del crecimiento del *C. sakazakii* se basa en datos *in vitro* que no se pueden extrapolar a efectos *in vivo*. Los resultados limitados de apenas un estudio *in vivo* que ha sido publicado hasta el momento demuestran efectos protectores de probióticos viables sobre la integridad del enterocito después de la infección por *C.*

sakazakii en un modelo de rata NEC, pero la protección contra la invasión del *C. sakazakii* al cerebro no ha sido demostrada antes. Así las cosas, sigue existiendo una gran necesidad de identificar una composición que reduzca o inhiba la invasión de patógenos como el *C. sakazakii*, a otros órganos como el cerebro y/o reduzca o inhiba la mortalidad causada por patógenos como el *C. sakazakii* sin tener que añadir microorganismos probióticos viables.

REVELACIÓN DE LA INVENCION

[0013] La presente revelación proporciona una composición que comprende un sobrenadante del cultivo de una fase de crecimiento exponencial tardío de un proceso de cultivo de probióticos por lotes, para usar en el tratamiento o la prevención de la infección por patógenos. En ciertas modalidades, el probiótico es LGG, y el patógeno es *C. sakazakii*.

[0014] En aspectos adicionales, la revelación proporciona un producto dietético que comprende una composición de probiótico no viable que se puede obtener de un sobrenadante del cultivo de una fase de crecimiento exponencial tardío de un proceso de cultivo de LGG por lotes, así como el uso de la anterior composición como un aditivo en un producto nutricional, para usar en el tratamiento o la prevención de la infección por *C. sakazakii*.

[0015] Todavía en otro aspecto, la revelación proporciona un método de tratamiento o prevención de la infección por patógenos en un sujeto, el cual método comprende la administración al mencionado sujeto de una cantidad efectiva de una composición que comprende un material probiótico no viable que se puede obtener de un sobrenadante del cultivo de una fase de crecimiento exponencial tardío de un proceso de cultivo de probióticos por lotes.

MEJOR MANERA DE REALIZAR LA INVENCION

[0016] En una primera modalidad, la revelación se relaciona con una composición que comprende un sobrenadante del cultivo de una fase de crecimiento exponencial tardío de un proceso de cultivo de probióticos por lotes, para usar en el tratamiento o la prevención de la infección por patógenos.

[0017] En algunas modalidades, la presente revelación se basa en la percepción de que a partir del cultivo por lotes de un probiótico como el LGG se puede cosechar un sobrenadante del cultivo (el cual también se puede designar como "medio gastado") que confiere protección contra la infección por un patógeno como el *C. sakazakii*, especialmente sobre la invasión del *C. sakazakii* a órganos como el cerebro; más aún, el medio gastado tiene un efecto sobre la mortalidad relacionada con el patógeno.

[0018] Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que esta actividad se puede atribuir a la mezcla de componentes (incluidos materiales proteínicos, y posiblemente incluidos materiales de (exo)polisacáridos) como los que se encuentran liberados dentro del medio de cultivo en una etapa tardía de la fase exponencial (o "logarítmica") de cultivo por lotes del probiótico. La composición se designará en lo sucesivo como "sobrenadante del cultivo de la revelación."

[0019] El *Lactobacillus rhamnosus* GG (*Lactobacillus* G.G., cepa ATCC 53103) es una bacteria que ha sido aislada de los intestinos de un sujeto humano sano. Es ampliamente reconocido como un probiótico, y por consiguiente se ha sugerido su incorporación a muchos productos nutricionales, como productos lácteos, suplementos nutricionales, sucedáneos de la leche materna para bebé, y similares. Fue revelado en la patente estadounidense No. 5.032.399 concedida a Gorbach, et al., la cual se incorpora a la presente en su integridad mediante referencia. LGG no es resistente a la mayoría de los antibióticos, es estable en presencia de ácido y bilis, y se adhiere con avidez a células de la mucosa del tracto intestinal humano. Persiste durante 1-3 días en la mayoría de los individuos y hasta 7 días en el 30% de los sujetos. Además de su capacidad de colonización, el LGG también afecta de modo beneficioso las respuestas inmunológicas de la mucosa. El LGG aparece en el repositorio de la Autoridad Americana de Colección de Tipos de Cultivo bajo el número ATCC 53103.

[0020] La presente revelación y modalidades de la misma proporcionan un sobrenadante del cultivo que es activo contra la infección por *C. sakazakii*; más particularmente, en ciertas modalidades, se presenta un método adecuadamente fácil de fermentación y cosecha dirigido a obtener del LGG un material probiótico no viable que soporta la actividad contra la invasión y la mortalidad por *C. sakazakii*.

[0021] Las etapas reconocidas en el cultivo por lotes de las bacterias conocidas por la persona medianamente versada en la materia técnica correspondiente. Se trata de las fases

de “retardo,” “log” (“logarítmica” o “exponencial”), “estacionaria” y de “muerte” (o “declinación logarítmica”). En todas las fases durante las cuales se encuentran presentes bacterias vivas, las bacterias metabolizan los nutrientes del medio, y segregan (expulsan, liberan) materiales al medio de cultivo. La composición del material segregado en un punto dado de tiempo de las etapas de crecimiento no es predecible en general.

[0022] En una modalidad preferida, una composición de acuerdo con la revelación y/o modalidades de la misma se puede obtener por un proceso que comprende las etapas de (a) someter un probiótico como el LGG a cultivo en un medio de cultivo apropiado usando un proceso por lotes; (b) cosechar el sobrenadante del cultivo en una fase tardía de crecimiento exponencial de la etapa de cultivo, la cual fase se define en referencia a la segunda mitad del tiempo entre la fase de retardo y la fase estacionaria del proceso de cultivo por lotes; (c) opcionalmente remover constituyentes de bajo peso molecular del sobrenadante de manera que se retengan constituyentes de peso molecular por encima de 5-6 kiloDaltons (kDa); (d) remover contenido líquido del sobrenadante del cultivo para así obtener la composición.

[0023] En la presente revelación y modalidades de la misma, los materiales segregados se cosechan de una fase exponencial tardía. La fase exponencial tardía tiene lugar en el tiempo después de la fase exponencial medios (que es la mitad del tiempo de la duración de la fase exponencial, de aquí la referencia a la fase exponencial tardía como la segunda mitad del tiempo entre la fase de retardo y la fase estacionaria). En particular, el término “fase exponencial tardía” se usa en este contexto en referencia al último cuarto del tiempo entre la fase de retardo y la fase estacionaria del proceso de cultivo de LGG por lotes. En una modalidad preferida de la presente revelación y modalidades de la misma, la cosecha del sobrenadante del cultivo tiene lugar en un punto de tiempo de 75% a 85% de la duración de la fase exponencial, y más preferible aún es en cerca de $\frac{5}{6}$ del tiempo transcurrido en la fase exponencial.

[0024] El término “cultivo” o “cultivar” se refiere a la propagación de microorganismos, en este caso el LGG, sobre o en un medio apropiado. Dicho medio de cultivo puede ser de una variedad de tipos, y es en particular un caldo líquido, como se acostumbra en el estado de la técnica. Un caldo preferido, p.ej., es el caldo MRS que se usa generalmente para el cultivo de lactobacilos. El caldo MRS suele comprender polisorbato, acetato, magnesio y manganeso, los cuales se sabe que obran como factores especiales de crecimiento para los lactobacilos, así como una rica base de nutrientes. Una composición típica comprende (cantidades en g/litro): peptona de caseína 10,0; extracto de carne 8,0; extracto de levadura 4,0; D(+)-glucosa 20,0; fosfato de potasio dihidrogenado 2,0; Tween® 80 1,0; citrato de triamonio 2,0; acetato de sodio 5,0; sulfato de magnesio 0,2; sulfato de manganeso 0,04.

[0025] Un uso preferido del sobrenadante del cultivo de la revelación y/o modalidades de la misma es en los sucedáneos de la leche materna para bebé. La cosecha de productos bacterianos segregados da lugar al problema de que los medios de cultivo no pueden ser fácilmente despojados de componentes indeseados. Esto específicamente se relaciona con productos nutricionales para sujetos relativamente vulnerables, como los sucedáneos de la leche materna para bebé o nutrición clínica. Este problema no surge si componentes específicos de un sobrenadante del cultivo son primero aislados, purificado, y luego aplicados a un producto nutricional. Con todo, se desea hacer uso de un sobrenadante de cultivo más completo. Esto serviría para proporcionar una composición que mejor refleje la acción natural del probiótico (es decir, el LGG). Sin embargo, no se puede simplemente usar el sobrenadante del cultivo mismo como base para materiales probióticos no viables que se van a usar específicamente en sucedáneos de la leche materna para bebé y similares.

[0026] Para que la revelación tenga pleno uso como está aquí descrito, se desea asegurar que la composición cosechada del cultivo de LGG no contenga componentes (como pueden estar presentes en el medio de cultivo) que no sean deseados o generalmente aceptados, en dicha fórmula. En referencia al polisorbato regularmente presente en el caldo MRS, los medios para el cultivo de bacterias pueden incluir un surfactante emulsionante no iónico, p.ej., basado en sorbitán polietoxilado y ácido oleico (típicamente disponible como polisorbatos Tween®, como Tween® 80). Aunque estos surfactantes se encuentran a menudo en productos alimenticios, p.ej., helado, y en general se los reconoce como seguros, en todas las jurisdicciones no se los considera deseables, o siquiera aceptable para usar en productos nutricionales para sujetos relativamente vulnerables, como sucedáneos de la leche materna para bebé o para nutrición clínica.

[0027] Por tanto, la presente revelación, en una modalidad preferida de la revelación y/o modalidades de la misma, también pertenece al uso de medios de cultivo en los cuales los polisorbatos arriba mencionados pueden ser evitados. Para tal efecto, un medio de cultivo preferido de la revelación está desprovisto de polisorbatos como Tween 80. En una modalidad preferida de la revelación y/o modalidades de la misma el medio de cultivo puede comprender un ingrediente oleoso seleccionado de entre el grupo compuesto por ácido oleico, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de colza, aceite de girasol y mezclas de los mismos. Se entenderá que el beneficio pleno del ingrediente oleoso se logra si la presencia de un surfactante de polisorbato es evitada esencial o completamente.

[0028] Más preferible aún para usar de la presente revelación, un medio MRS está desprovisto de polisorbatos. También de preferencia el medio comprende, además de uno o más de los anteriores aceites, peptona (típicamente 0-10 g/L, especialmente 0,1-10 g/L), extracto de carne (típicamente 0-8 g/L, especialmente 0,1-8 g/L), extracto de levadura

(típicamente 4-50 g/L), D(+) glucosa (típicamente 20-70 g/L), fosfato de potasio dihidrogenado (típicamente 2-4 g/L), acetato de sodio trihidratado (típicamente 4-5 g/L), citrato de triamonio (típicamente 2-4 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado (típicamente 0,2-0,4 g/L) y/o sulfato de manganeso tetrahidratado (típicamente 0,05-0,08 g/L).

[0029] El cultivo generalmente se lleva a cabo a una temperatura de 20°C a 45°C, de preferencia a 35 °C a 40°C, y más preferible aún a 37°C. De preferencia la composición de la revelación y/o modalidades de la misma tiene un pH neutro, como un pH de entre pH 5 y pH 7, de preferencia pH 6. También es deseable que la composición de la revelación y/o modalidades de la misma no contenga constituyentes con peso por debajo de 5-6 kDa. Cabe anotar que parte de las pruebas del estado de la técnica indicadas arriba ha demostrado que los sobrenadantes solo ejercieron un efecto cuando el pH era de cerca de 4, y no se observó efecto cuando el pH fue neutro. De forma correspondiente, esta actividad antimicrobiana en el estado de la técnica ha sido asociada con la presencia de ácido láctico.

[0030] El punto de tiempo preferido durante el cultivo para cosechar el sobrenadante del cultivo, es decir, en la arriba mencionada fase exponencial tardía, puede ser determinado, p.ej., con base en la OD600nm y la concentración de glucosa. OD600 se refiere a la densidad óptica a 600 nm, que es una medida conocida de densidad que se correlaciona directamente con la concentración bacteriana en el medio de cultivo.

[0031] Además de lo anterior, cabe anotar que el cultivo por lotes de los lactobacilos, incluido el LGG, es conocimiento general comúnmente disponible para la persona medianamente versada en la materia técnica correspondiente. Estos métodos por tanto no requieren mayor elaboración aquí.

[0032] De preferencia, la composición de la revelación y/o modalidades de la misma es producida por fermentación a gran escala (p.ej., En un fermentador de más de 100 L, de preferencia cerca de 200 L o más).

[0033] La composición de la revelación y/o modalidades de la misma puede ser cosechada por cualquier técnica conocida de separación del sobrenadante del cultivo de un cultivo bacteriano. Dichas técnicas son bien conocidas en el estado de la técnica e incluyen, p.ej., centrifugación, filtración, sedimentación, y similares.

[0034] El sobrenadante de la presente revelación y modalidades de la misma se puede usar de inmediato, o almacenarlo para uso futuro. En este último caso, el sobrenadante en general será refrigerado, congelado o liofilizado. El sobrenadante puede concentrarse o diluirse, como se desee.

[0035] Igual que sucede con todas las sustancias químicas, se piensa que la composición del sobrenadante del cultivo de la revelación y/o modalidades de la misma es una mezcla de una pluralidad de aminoácidos, oligo y polipéptidos, y proteínas, de varios pesos

M
~

moleculares. Además, se piensa que la composición comprende estructura de polisacáridos y/o nucleótidos.

[0036] Se hace énfasis en que, a diferencia del estado de la técnica, la revelación y/o modalidades de la misma de preferencia pertenece a todo el sobrenadante del cultivo, es decir, sin fraccionar. Se piensa que la elección juiciosa de cosechar en la arriba mencionada fase exponencial tardía, y la retención de prácticamente todos los componentes del sobrenadante, contribuyen a los sorprendentes resultados obtenidos con él, en particular en vista de la actividad preventiva contra la infección por *C. sakazakii* y más particularmente en vista de dicha actividad en bebés y neonatos, y luego de la administración perinatal a mujeres embarazadas o lactantes.

[0037] El sobrenadante completo del cultivo de la presente revelación y modalidades de la misma es más específicamente definido como sustancialmente exclusivo de componentes de bajo peso molecular, por lo general por debajo de 6 kDa, o incluso por debajo de 5 kDa. Esto se relaciona con el hecho de que la composición de preferencia no incluye ácido láctico y/o sales de lactato. El sobrenadante preferido de la revelación y/o modalidades de la misma por ello tiene un peso molecular de más de 5kDa o, en algunas modalidades, más de 6kDa. Esto suele involucrar involucra filtración o cromatografía de columna. En efecto, el retenido de esta filtración representa un intervalo de peso molecular de más de 6 kDa (en otras palabras, los constituyentes por debajo de 6 kDa son filtrados).

[0038] La composición del sobrenadante de la revelación y/o modalidades de la misma en general no solo será proteínica, sino también comprenderá polisacáridos, en particular exopolisacáridos (polímeros de alto peso molecular compuestos de residuos de azúcar como los producidos por el LGG). Sin desear quedar ligado a la teoría, los inventores creen que la proporción entre las cantidades de materiales proteínicos y las cantidades de materiales carbohidratos cosechados en la fase exponencial tardía como se discutió arriba, contribuye a la naturaleza protectora del sobrenadante contra la infección por *C. sakazakii* en comparación con composiciones cosechadas en otras etapas como, p.ej., la fase exponencial media o la fase estacionaria.

[0039] El sobrenadante del cultivo de la presente revelación y modalidades de la misma cosechado de conformidad con la revelación puede ser puesto en uso de varias formas, para aprovechar el beneficio encontrado de la actividad contra *C. sakazakii*. Dicho uso en general involucrará alguna forma de administración de la composición de la revelación y/o modalidades de la misma a un sujeto que tiene necesidad de la misma. A este respecto, el sobrenadante del cultivo se puede usar tal cual, p.ej., incorporado a cápsulas para administración oral, o en una composición nutricional líquida como una bebida, o puede ser procesado antes de uso ulterior. Esto último se prefiere.

[0040] Dicho procesamiento generalmente involucra separar los compuestos de la fase continua generalmente líquida del sobrenadante. Esto de preferencia se hace con un método de secado, como secado en aerosol o liofilizado (liofilización). El secado en aerosol es preferido. En una modalidad preferida del método de secado en aerosol, un material de transporte será añadido antes del secado en aerosol como, p.ej., maltodextrina DE29.

[0041] Se ha encontrado que la composición de la revelación y/o modalidades de la misma posee actividad protectora contra la infección por *C. sakazakii*, es decir, actividad preventiva y/o terapéutica. La infección por *C. sakazakii* puede conducir a adherencia de las bacterias a las células epiteliales, pérdida de la arquitectura de la vellosidad, apoptosis de la célula epitelial, invasión del patógeno a otros órganos extraintestinales, interferencia con el sistema inmunológico del huésped, bacteremia, meningitis, retardo del desarrollo, retardo mental, hidrocefalia, enterocolitis necrotizante (NEC) y/o muerte. El sobrenadante del cultivo de la presente revelación o modalidades de la misma puede tener un impacto sobre cualquiera de estos efectos, de preferencia tiene un impacto sobre por lo menos uno de estos efectos seleccionado de entre el grupo compuesto por adherencia de las bacterias a las células epiteliales, pérdida de la arquitectura de la vellosidad, apoptosis de la célula epitelial, invasión del patógeno a otros órganos extraintestinales, interferencia con el sistema inmunológico del huésped, bacteremia, meningitis, retardo del desarrollo, retardo mental, hidrocefalia, enterocolitis necrotizante (NEC) y/o muerte y/o combinaciones de los mismos, más de preferencia sobre por lo menos dos de estos efectos, todavía más de preferencia sobre por lo menos tres de estos efectos, y más preferible todavía sobre por lo menos 4 o más de estos efectos. En una modalidad preferida el sobrenadante del cultivo de la presente revelación o modalidades de la misma tiene un impacto sobre por lo menos uno de los efectos seleccionado de entre el grupo compuesto por adherencia de las bacterias a las células epiteliales, apoptosis de la célula epitelial, invasión del patógeno a otros órganos extraintestinales, bacteremia, meningitis, enterocolitis necrotizante (NEC) y/o muerte y/o combinaciones de los mismos.

[0042] Para que la composición de la revelación ejerza su efecto beneficioso anti-*C. sakazakii*, tiene que ser digerida por un sujeto, de preferencia un sujeto humano. En particular, en una modalidad preferida, el sujeto es una mujer embarazada, una mujer en lactancia, un neonato, un bebé, o un niño. Como se dijo arriba, las ventajas de usar un material que podría ser considerado como un "probiótico no viable," serán apreciadas principalmente en los productos dietéticos para bebés. El término "bebé" significa un ser humano postnatal de menos de cerca de 1 año de edad.

[0043] Se entenderá que digestión por un sujeto requerirá la administración oral de la composición de la revelación. La forma de administración de la composición de conformidad

con la revelación no es crítica. En algunas modalidades, la composición se administra a un sujeto por medio de tabletas, píldoras, encapsulaciones, grageas, cápsulas de gelatina, cápsulas, gotas de aceite, o sobres. En otra modalidad, la composición está encapsulada en un azúcar, grasa, o polisacárido.

[0044] Todavía en otra modalidad, la composición se añade a un producto alimenticio o bebida y se consume. El producto alimenticio o bebida puede ser un producto nutricional para niños como un sucedáneo de la leche materna para seguimiento, leche para la etapa del crecimiento, bebida, leche, yogurt, jugo de fruta, bebida a base de fruta, tableta masticable, galleta, galleta de soda, o leche en polvo. En otras modalidades, el producto puede ser un producto nutricional para bebé, como un sucedáneo de la leche materna para bebé o un enriquecedor de la leche humana.

[0045] La composición de la revelación, ya sea que se añada en una forma de dosificación separada o a través de un producto nutricional, generalmente será administrada en una cantidad efectiva para el tratamiento o la prevención de la infección por patógenos. La cantidad efectiva es de preferencia equivalente a 1×10^4 a cerca de 1×10^{12} equivalentes celulares de bacterias probióticas vivas por kg de peso corporal por día, y más de preferencia 10^8 - 10^9 equivalentes celulares por kg de peso corporal por día. El cálculo retrógrado a equivalentes celulares cae bien dentro del ámbito del conocimiento de la persona versada en la técnica.

[0046] Si la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se administra a través de un sucedáneo de la leche materna para bebé, el sucedáneo de la leche materna para bebé puede ser nutricionalmente completo y contener tipos y cantidades adecuados de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. La cantidad de lípido o grasa típicamente puede variar de cerca de 3 a cerca de 7 g/100 kcal. Las fuentes de lípidos pueden ser cualquiera de las conocidas o empleadas en el estado de la técnica, p.ej., aceites vegetales como aceite de palma, aceite de soya, palmoleína, aceite de coco, aceite de triglicéridos de cadena media, aceite de girasol alto en oleico, aceite de cártamo alto en oleico, y similares. La cantidad de proteína típicamente puede variar de cerca de 1 a cerca de 5 g/100 kcal. Las fuentes de proteína pueden ser cualquiera de las conocidas o empleadas en el estado de la técnica, p.ej., leche descremada, proteínas del suero, caseína, proteínas de soya, proteína hidrolizada (parcial o extensamente), aminoácidos, y similares. La cantidad de carbohidratos típicamente puede variar de cerca de 8 a cerca de 12 g/100 kcal. Las fuentes de carbohidratos pueden ser cualquiera de las conocidas o empleadas en el estado de la técnica, p.ej., lactosa, glucosa, sólidos del jarabe de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón, sólidos del jarabe de arroz, y similares.

[0047] De forma conveniente, se pueden usar los productos nutricionales para prenatal, prematuros, bebés y niños que se encuentran comercialmente disponibles. Por ejemplo, Expecta® Enfamil®, Enfamil® Premature Formula, Lactofree®, Nutramigen®, Gentlease®, Pregestimil®, ProSobee®, Enfakid®, Enfaschool®, Enfagrow®, Kindercal® (disponibles en Mead Johnson Nutrition Company, Glenview, Illinois, U.S.) pueden ser suplementados con niveles adecuados de la composición de la revelación y empleados en la práctica del método de la revelación.

[0048] En una modalidad, la composición de la revelación y/o modalidades de la misma puede ser combinada con uno o más probióticos viables. Cualquier probiótico viable conocido en el estado de la técnica puede ser aceptable en esta modalidad siempre y cuando alcance el resultado buscado.

[0049] Si un probiótico viable se administra en combinación con la composición de la revelación, la cantidad de probiótico viable puede corresponder a entre cerca de 1×10^4 y 1×10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc) por kg de peso corporal por día. En otra modalidad, los probióticos viables pueden comprender entre cerca de 1×10^6 y 1×10^{12} ufc por kg de peso corporal por día. Todavía en otra modalidad, los probióticos viables pueden comprender cerca de 1×10^9 ufc por kg de peso corporal por día. Todavía en otra modalidad, los probióticos viables pueden comprender cerca de 1×10^{10} ufc por kg de peso corporal por día.

[0050] En otra modalidad, la composición de la revelación y/o modalidades de la misma pueden ser combinados con uno o más prebióticos. Un "prebiótico" significa un ingrediente alimenticio no digerible que estimula el crecimiento y/o actividad de bacterias del tracto digestivo de formas que se supone son beneficiosas para la salud. Cualquier prebiótico conocido del estado de la técnica será aceptable en esta modalidad siempre y cuando alcance el resultado deseado. Los prebióticos útiles para la presente revelación pueden incluir lactulosa, gluco-oligosacárido, inulina, polidextrosa, galacto-oligosacárido, fructo-oligosacárido, isomalto-oligosacárido, oligosacáridos de la soya, lactosacarosa, xilo-oligosacárido, y gentio-oligosacáridos.

[0051] Todavía en otra modalidad de la presente revelación y modalidades de la misma, el sucedáneo de la leche materna para bebé puede contener otros agentes activos como ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA). Los LCPUFA adecuados incluyen, pero sin limitaciones, ácido [alfa]-linoleico, ácido [gamma]-linoleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosapentanoico (EPA), ácido araquidónico (ARA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA). En una modalidad, la composición de la revelación se administra en combinación con DHA. En otra modalidad, la composición de la revelación se administra en combinación con ARA. Todavía en otra modalidad, la composición de la revelación y/o

modalidades de la misma se administra en combinación con DHA y ARA. El sucedáneo de la leche materna para bebé comercialmente disponible que contiene DHA, ARA, o una combinación de los mismos puede ser suplementado con la composición de la revelación y empleado en la presente revelación. Por ejemplo, el Enfamil® LIPIL®, que contiene niveles efectivos de DHA y ARA, se encuentra comercialmente disponible y puede ser suplementado con la composición de la revelación y utilizado en la presente revelación. Si se incluye, la cantidad efectiva de ARA en una modalidad de la presente revelación es típicamente de cerca de 5 mg por kg de peso corporal por día a cerca de 150 mg por kg de peso corporal por día. En una modalidad de la presente revelación y modalidades de la misma la cantidad varía de cerca de 10 mg por kg de peso corporal por día a cerca de 120 mg por kg de peso corporal por día. En otra modalidad, la cantidad varía de cerca de 15 mg por kg de peso corporal por día a cerca de 90 mg por kg de peso corporal por día. Todavía en otra modalidad, la cantidad varía de cerca de 20 mg por kg de peso corporal por día a cerca de 60 mg por kg de peso corporal por día. Si se utiliza un sucedáneo de la leche materna para bebé, la cantidad de DHA en el sucedáneo de la leche materna para bebé puede variar de cerca de 5 mg/100 kcal a cerca de 80 mg/100 kcal. En una modalidad de la presente revelación, DHA varía de cerca de 10 mg/100 kcal a cerca de 50 mg/100 kcal; y en otra modalidad, de cerca de 15 mg/100 kcal a cerca de 20 mg/100 kcal. En una modalidad particular de la presente revelación, la cantidad de DHA es de cerca de 17 mg/100 kcal. Si se utiliza un sucedáneo de la leche materna para bebé, la cantidad de ARA en el sucedáneo de la leche materna para bebé puede variar de cerca de 10 mg/100 kcal a cerca de 100 mg/100 kcal. En una modalidad de la presente revelación, la cantidad de ARA varía de cerca de 15 mg/100 kcal a cerca de 70 mg/100 kcal. En otra modalidad, la cantidad de ARA varía de cerca de 20 mg/100 kcal a cerca de 40 mg/100 kcal. En una modalidad particular de la presente revelación, la cantidad de ARA es cerca de 34 mg/100 kcal.

[0052] Si se utiliza un sucedáneo de la leche materna para bebé, el sucedáneo de la leche materna para bebé puede ser suplementado con aceites que contienen DHA y ARA usando técnicas estándar conocidas del estado de la técnica. Por ejemplo, DHA y ARA se pueden añadir al sucedáneo de la leche materna reemplazando una cantidad equivalente de un aceite, como aceite de girasol alto en oleico, normalmente presente en el sucedáneo de la leche materna. En otro ejemplo, los aceites que contienen DHA y ARA se pueden añadir al sucedáneo de la leche materna reemplazando una cantidad equivalente del resto de la mezcla general de grasas normalmente presente en el sucedáneo de la leche materna sin DHA y ARA. Si se utiliza, la fuente de DHA y ARA puede ser cualquier fuente conocida del estado de la técnica como aceite marino, aceite de pescado, aceite de célula única, lípidos de la yema del huevo, lípidos del cerebro, y similares. En algunas modalidades, el

DHA y el ARA se obtienen del aceite de célula única de Martek, DHASCO®, o variaciones del mismo. El DHA y el ARA pueden estar en forma natural, siempre y cuando el resto de la fuente de LCPUFA no redunde en un efecto nocivo sustancial para el bebé. Como alternativa, el DHA y el ARA se pueden usar en forma refinada. En una modalidad de la presente revelación, las fuentes de DHA y ARA son aceites de célula única como los que se enseñan en las patentes estadounidenses Nos. 5.374.567; 5.550.156; y 5.397.591, cuyas revelaciones se incorporan a la presente en su integridad mediante referencia. Sin embargo, la presente revelación no está limitada solamente a esos aceites.

[0053] En una modalidad, una fuente de LCPUFA que contiene EPA se usa en combinación con por lo menos una composición de la revelación. En otra modalidad, una fuente de LCPUFA que está sustancialmente libre de EPA se usa en combinación con por lo menos una composición de la revelación. Por ejemplo, en una modalidad de la presente revelación, un sucedáneo de la leche materna para bebé que contiene menos de cerca de 16 mg EPA/100 kcal es suplementado con la composición de la revelación. En otra modalidad, un sucedáneo de la leche materna para bebé que contiene menos de cerca de 10 mg EPA/100 kcal es suplementado con la composición de la revelación. Todavía en otra modalidad, un sucedáneo de la leche materna para bebé que contiene menos de cerca de 5 mg EPA/100 kcal es suplementado con la composición de la revelación.

[0054] Otra modalidad de la revelación y/o modalidades de la misma incluye un sucedáneo de la leche materna para bebé suplementado con la composición de la revelación que está libre incluso de trazas de EPA. Se cree que la proporción de una combinación de la composición de la revelación con DHA y/o ARA proporciona efectos complementarios o sinérgicos en lo que respecta a las propiedades protectoras contra la infección por *C. sakazakii* de las formulaciones que contienen estos agentes.

[0055] En otra modalidad preferida de la presente revelación y modalidades de la misma, el producto dietético de la revelación comprende uno o más materiales bioactivos normalmente presentes en la leche materna humana, como proteínas o polisacáridos. De preferencia el producto dietético de la revelación comprende lactoferrina.

[0056] En otro aspecto de la revelación la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se usa con el fin de reducir, inhibir, aminorar o tratar la infección por *C. sakazakii*.

[0057] En una modalidad preferida de la revelación y/o modalidades de la misma la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se usa con el fin de reducir, inhibir y/o aminorar por lo menos una condición seleccionada de entre el grupo compuesto por adherencia de las bacterias a las células epiteliales, pérdida de la arquitectura de la vellosidad, apoptosis de la célula epitelial, invasión del patógeno a otros

20

órganos extraintestinales, interferencia con el sistema inmunológico del huésped, bacteremia, meningitis, retardo del desarrollo, retardo mental, hidrocefalia, enterocolitis necrotizante (NEC) y/o muerte y/o combinaciones de los mismos, de preferencia por lo menos dos condiciones, más de preferencia por lo menos 3 o más condiciones.

[0058] De preferencia la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se usa con el fin de fin de reducir, inhibir y/o aminorar la invasión a órganos como cerebro, hígado, bazo, ciego, epitelio intestinal, mesenterio, líquido cefalorraquídeo, sangre, de preferencia la invasión a cerebro, hígado, bazo, más de preferencia la invasión al cerebro. En una modalidad preferida la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se usa con el fin de fin de reducir, inhibir y/o aminorar el retardo mental debido a la infección por *C. sakazakii*. La revelación y/o modalidades de la revelación y/o modalidades. En una modalidad preferida de la revelación y/o modalidades de la misma la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se usa con el fin de fin de reducir, inhibir y/o aminorar la tasa de mortalidad de la infección por *C. sakazakii*.

[0059] Otro aspecto de la revelación se relaciona con el uso de una composición de acuerdo con la revelación y/o modalidades de la misma en la prevención de la infección por *C. sakazakii*. La composición de la presente revelación y modalidades de la misma es muy adecuada para uso profiláctico.

[0060] De preferencia la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se usa para prevenir la invasión de órganos como hígado, bazo y/o cerebro relacionada con la infección por *C. sakazakii*.

[0061] De preferencia la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se usa para prevenir la bacteriemia de la infección por *C. sakazakii*.

[0062] De preferencia la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se usa para prevenir la meningitis causada por una infección por *C. sakazakii*,

[0063] De preferencia la composición de la revelación y/o modalidades de la misma se usa para prevenir la enterocolitis necrotizante (NEC) causada por una infección por *C. sakazakii*.

[0064] Todavía otro aspecto de la revelación se relaciona con el tratamiento de la infección por *C. sakazakii* usando la composición de la revelación y/o modalidades de la misma. De preferencia la revelación y/o modalidades de la misma se relaciona con el tratamiento de la invasión de órganos como hígado, bazo y/o cerebro relacionada con la infección por *C. sakazakii*.

[0065] De preferencia la revelación y/o modalidades de la misma se relaciona con el tratamiento de la bacteriemia de la infección por *C. sakazakii*.

70

[0066] De preferencia la revelación y/o modalidades de la misma se relaciona con el tratamiento de la meningitis causada por una infección por *C. sakazakii*,

[0067] De preferencia la revelación y/o modalidades de la misma se relaciona con el tratamiento de la enterocolitis necrotizante (NEC) causada por una infección por *C. sakazakii*.

[0068] Con referencia a las desventajas arriba mencionadas del uso de probióticos vivos o viables, la presente revelación ofrece el beneficio particular de sustituir esos probióticos en productos que sirven para prevenir, reducir, aminorar o tratar la infección por *C. sakazakii* y/o los síntomas de la misma. Para tal efecto la composición de preferencia se administra a través de un producto dietético o nutricional, más de preferencia una fórmula o composición nutricional prenatal, para bebé o para niño, un alimento médico, o un alimento para propósitos médicos específicos (es decir, un alimento etiquetado para un propósito médico específico), más preferible aún un sucedáneo de la leche materna para bebé, o nutrición perinatal para mujeres embarazadas o en lactancia, como se discutió sustancialmente arriba. Además, la revelación también permite proporcionar probióticos en una forma mejorada. Esto, porque los materiales derivados de probióticos no viables de acuerdo con la revelación pueden ser producidos en una forma estandarizada y reproducible en un ambiente industrial, evitando aquellos problemas que son inherentes a los probióticos vivos. Así mismo, en virtud de la naturaleza no viable y en particular cuando se proporcionan como un polvo seco, pueden incorporarse y dosificarse adecuadamente composiciones nutricionales para la prevención o el tratamiento de la infección por *C. sakazakii*.

[0069] La revelación será ilustrar en lo sucesivo haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Materiales y métodos

[0070] Animales. Se obtuvieron ratonas CD-1 con preñez programada de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) en el día gestacional (GD) 17. Los animales fueron mantenidos en un bioterio con un ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 horas. Las hembras preñadas fueron alojadas individualmente y se les permitió dar a luz naturalmente en el GD 19 o 20. Los ratones neonatos fueron sexados y asignados aleatoriamente a madres sustitutas. El alimento para roedores y el agua de beber estuvieron disponibles *ad libitum*.

[0071] Preparación de LGG, sobrenadante LGG, *C. sakazakii* y cultivos. El probiótico LGG (proporcionado por Mead Johnson Nutrition) se activó a través de tres transferencias sucesivas en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Oxoid, LTD, Basingstoke, Inglaterra) y se incubó a 37°C durante 24 h. Las células fueron aisladas mediante centrifugación (8.000 x g a 4°C durante 15 min), lavadas dos veces con salina con amortiguador de fosfato (PBS), y

resuspendidas en vehículo a una concentración de 10⁶UFC/mL LGG. El sobrenadante LGG se preparó en un proceso de fermentación por lotes.

[0072] Se usó el siguiente medio de cultivo (un caldo MRS adaptado) (Tabla 1).

Tabla 1

Componente	(kg)
<i>Solución 1 (esterilizada por separado en autoclave a 110°C)</i>	
Glucosa H ₂ O	13,2
Agua desmineralizada	10,8
<i>Solución 2 (esterilizada en autoclave a 121 °C)</i>	
Tween-80	0,4
Acetato de sodio·3 H ₂ O	2,0
NH ₄ Cl	0,528
Na ₃ -citrato·2 H ₂ O	0,960
K ₂ HPO ₄	0,800
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,080
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,016
Extracto de levadura (Gistex LS, Polvo)	9,20
Agua desmineralizada	162
Total	200 L fermentación

[0073] LGG se cultivó a un pH constante de 6 por la adición de 33% NaOH a 37°C con una velocidad de agitador de 50 rpm, el espacio muerto fue purgado con N₂. En la fase tardía de crecimiento exponencial, las células bacterianas fueron separadas del medio por centrifugación a 14000 x g y 4°C durante 15 min, el aglomerado de células se desechó y el medio gastado se almacenó a -20°C. Este material se desalinizó y liofilizó y, antes de usarlo en el experimento con animales, se reconstituyó para ser probado en el modelo de infección por *C. sakazakii* en animales (en lo sucesivo designado como sobrenadante LGG).

[0074] Para la preparación de LGG viable, la concentración de la dosis se determinó midiendo la densidad óptica (OD) del cultivo y comparándola con una curva estándar desarrollada a través de diluciones seriadas del cultivo. La dosis entonces fue confirmada sembrando el LGG en agar tríptico de soya (TSA) (Oxoid) durante 24 h, y calculando UFC/mL. Una dosis de 10⁵ UFC/día LGG o una dosis correspondiente de sobrenadante

LGG se usó para el tratamiento y se administró junto con vehículo. Los cultivos raíz de *C. sakazakii* (cepa 3290) congelados sobre perlas de cerámica a -80°C fueron cultivados para examinar las concentraciones en caldo triptico de soya (TSB) (Oxoid, 3 LTD, Basingstoke, Inglaterra). El cultivo de *C. sakazakii* se preparó y la dosis se confirmó como quedó descrito para el LGG, excepto que las células fueron activadas a través de 2 transferencias sucesivas en TSB.

Tratamiento de los ratones

[0075] Los métodos de tratamiento para este estudio han sido descritos previamente (Richardson, A. N., S. Lambert y M.A. Smith. 2009. "Neonatal mice as models for *Cronobacter sakazakii* infection in infants." *J Food Prot* 174; 72(11): 2363-2367"). En pocas palabras, los cachorros fueron tratados con LGG y el sobrenadante LGG en sucedáneo de la leche materna en polvo reconstituido para bebé (RPIF) en los primeros cuatro días postnatales consecutivos (PND) 1 a 4, y con *C. sakazakii* on PND 2 a través de sonda oral usando una aguja de alimentación animal de acero inoxidable 24 x 1" (25.4 mm) W/1-1¼ (Popper & Sons, Inc., New Hyde Park, N.Y.) conectada a una jeringa de 1 mL. RPSI se mezcló con agua desionizada estéril para reconstitución, siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de asignación de la camada, se aplicó sabor a vainilla (The Kroger Co., Cincinnati, O.H.) a la nariz (hocico) de cada madre para enmascarar los aromas animales y crear confusión olfativa. Esto se hizo con el fin de aumentar la aceptación de los cachorros por las madres sustitutas. Se prepararon diluciones seriadas de sucedáneo de la leche materna en polvo reconstituido para bebé inoculadas con varias concentraciones de *C. sakazakii* cepa 3290. Cada cachorro recibió un volumen de 0.1 mL de RPSI con dosis confirmadas de *C. sakazakii* de 10^7 , 10^8 , y 10^{11} UFC/dosis o el vehículo de control. Los neonatos fueron observados para determinar la morbilidad o mortalidad dos veces al día durante el periodo posterior al tratamiento. Todos los cachorros viables en el día post-tratamiento (PTD) 7 fueron sacrificados. Los datos de mortalidad se presentan como mortalidad total (Tabla 3A) durante el curso de todo el periodo de estudio y como mortalidad ajustada (Tabla 3B) contando solo aquellas muertes que sobrevinieron 24 h después de el último tratamiento de alimentación por sonda. La mortalidad ajustada se calculó para remover muertes que pudieran haber estado relacionadas con la técnica de la alimentación forzada o el estrés de exposiciones repetidas a la alimentación forzada.

24

Cultivo de *C. sakazakii* de muestras de tejido

[0076] Se obtuvieron los hígados, ciegos, y cerebros de los ratones neonatales y se almacenaron en una bolsa de filtro Whirl Pack (Nasco, Fort Atkinson, WI) sobre hielo para cultivo. Se añadió caldo de enriquecimiento de *Enterobacter* (EE) (Oxoid) a la muestra en una proporción de 10 mL EE por 1 g de muestra. Las muestras fueron sembradas sobre placas de agar de glucosa bilis rojo violeta (VRBG) por duplicado para crecimiento selectivo del *Enterobacter* spp, y luego se incubaron a 37°C durante 24 h. Los crecimientos fueron cultivados secundariamente sobre placas TSA e incubados durante 48 h a 25°C. Se usó el RapID A Identification System (Remel, Inc., Lenexa, K.S., USA) para la confirmación bioquímica positiva del aislamiento de *C. sakazakii*.

Análisis estadísticos

[0077] Los análisis estadísticos de los datos de infectividad y mortalidad del *C. sakazakii* se hicieron usando SAS versión 9.1 (SAS Institute, Cary, N.C.) y Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, W.A.). Las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en los valores obtenidos comparando las edades de animales tratados se determinaron usando la prueba de Scheffe y la prueba t Excel. Las pruebas para el análisis de varianza de una vía (ANOVA) se hicieron usando la prueba t de Dunnett y la prueba t de Excel para determinar diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y el grupo de control ($P \leq 0,05$) para cada edad de ratón.

Resultados

[0078] Para obtener un número suficiente de animales para análisis estadístico, los siguientes datos son los resultados combinados de tres experimentos independientes. La Tabla 2A muestra el porcentaje de animales de los cuales se aisló *C. sakazakii* de cualquier tejido. El número de tejidos invadidos por *C. sakazakii* se redujo significativamente en cerca de la mitad cuando los neonatos recibieron tratamientos conjuntos bien sea con LGG o con sobrenadante LGG (Tabla 2A). La concentración de *C. sakazakii* dada a los animales individuales en los tres experimentos varió de 10^8 - 10^{12} UFC/mL. Sin embargo, el número de tejidos invadidos y los tipos de tejidos invadidos no fueron dependientes de la dosis, y esto concuerda con nuestro trabajo anterior. El *C. sakazakii* no fue aislado del sobrenadante LGG ni del grupo de control con RPSI. Si bien el peso promedio al sacrificio varió de 5,39 – 6,22 g, no se encontró diferencia significativa.

Tabla 2A. Porcentaje de animales con por lo menos una muestra de tejido invadida y pesos promedios después de exposición a *C. sakazakii* con o sin LGG o sobrenadante LGG.

34

Grupo de tratamiento	Animales positivos para <i>C. sakazakii</i> (#/total tratados)	Peso promedio de los cachorros en el sacrificio (g)
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC)*	26% (15/58) A**	5,39 ± 0,935
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC) más sobrenadante LGG	20% (10/49) B	6,01 ± 1,38
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC) más LGG	17% (6/36) B	6,22 ± 1,76
LGG Sobrenadante de control	0% (0/55) C	5,52 ± 0,962
Sucedáneo de la leche materna en polvo para bebé de control	0% (0/49) C	5,95 ± 1,04

*Las dosis de *C. sakazakii* representan una combinación de tres experimentos independientes realizados con concentraciones de *C. sakazakii* at 10⁸, 10⁹, o 10¹² UFC/mL.

**Los grupos de tratamiento con la misma letra no son estadísticamente diferentes. (p ≤ 0,05).

[0079] Cuando se examinaron los tejidos individuales de los animales tratados con *C. sakazakii* solamente, el cerebro tendió a tener aislamiento de *C. sakazakii* en un porcentaje más alto de los animales que el hígado o el bazo. El tratamiento conjunto con LGG o sobrenadante LGG redujo la invasión en el cerebro en cerca de 50% (Tabla 2B). Dado que el cerebro es un tejido diana de *C. sakazakii* en los seres humanos, esto podría ser un importante hallazgo para el desarrollo de terapias y/o la prevención de efectos adversos en el cerebro. Si bien la tasa global de invasión del hígado fue de solo 15%, es digno de mención que en animales que reciben LGG como tratamiento conjunto, jamás aislamos *C. sakazakii* de tejidos hepáticos en ningún experimento y el tratamiento conjunto con sobrenadante LGG redujo el aislamiento de *C. sakazakii* en el hígado en cerca de la mitad (Tabla 2B). En tanto que tanto el tratamiento con LGG como con el sobrenadante LGG redujeron significativamente el aislamiento de *C. sakazakii* de tejidos cerebral y hepático, solo el tratamiento con LGG redujo significativamente el *C. sakazakii* en la invasión a tejidos esplénicos (Tabla 2B).

35

Tabla 2B. Porcentaje de animales en los cuales se aisló *C. sakazakii* en tejidos cerebral, hepático o esplénico después de la exposición a *C. sakazakii* con o sin LGG o sobrenadante LGG.

Grupo de tratamiento	Animales positivos para <i>C. sakazakii</i> invasión a cerebro (#/total tratados)	Animales positivos para <i>C. sakazakii</i> invasión a hígado	Animales positivos para <i>C. sakazakii</i> invasión a bazo
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC)*	19% (11/58) A	16% (9/58) A	10% (6/58) A
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC) más sobrenadante LGG	7% (4/54) B	9% (5/54) B	13% (7/54) A, B
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC) más LGG	8% (3/37) B	0% (0/37) B	3% (1/37) B, C
LGG Sobrenadante control	0% (0/55) C	0% (0/55) B	0% (0/55) C
Sucedáneo de la leche materna en polvo para bebé de control	0% (0/49) C	0% (0/49) B	0% (0/49) C

[0080] Los grupos de tratamiento con la misma letra no son estadísticamente diferentes. (p ≤ 0,05).

[0081] Se mantuvieron los registros de todos los cachorros que murieron antes del sacrificio programado. La Tabla 3 muestra los resultados combinados de mortalidad de tres experimentos. Para cualquier grupo que recibió *C. sakazakii*, la tasa global de mortalidad fue cercana al 30% (Tabla 3A).

Tabla 3. Mortalidad de neonatos CD-1 después de tratamiento con *C. sakazakii* con o sin LGG o sobrenadante LGG.*

236

Tabla 3A: Mortalidad total

Grupo de tratamiento	Mortalidad (#/total tratados)
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC)	34% (24/71) A
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC) más sobrenadante LGG	29% (17/58) A
<i>C. sakazakii</i> más LGG	33% (20/60) A
Sobrenadante control	7% (4/58) B
Sucedáneo de la leche materna en polvo para bebé solamente	7% (4/61) B

Tabla 3B: Mortalidad ajustada:

Grupo de tratamiento	Mortalidad (#/total tratados)
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC)	20% (12/59) A
<i>C. sakazakii</i> (10 ⁸⁻¹² UFC) más sobrenadante LGG	0% (0/41) B
<i>C. sakazakii</i> más LGG	17% (8/48) A
Sobrenadante control	2% (1/55) C
Sucedáneo de la leche materna en polvo para bebé solamente	0% (0/57) B

[0082] Los grupos de tratamiento con la misma letra no son estadísticamente diferentes. (p ≤ 0,05).

[0083] Esto estuvo en contraposición con los dos grupos de control con vehículo que no recibieron *C. sakazakii* que tuvieron una tasa de mortalidad de cerca de 7%. Cuando los datos se ajustaron de acuerdo con nuestra definición de muertes relacionadas con *C. sakazakii* (contando solo aquellas muertes que sobrevivieron 24 h o más después del tratamiento con alimentación forzada), la mortalidad se redujo en cerca de un tercio en los

grupos de *C. sakazakii* y *C. sakazakii* más LGG (Tabla 3B). La mortalidad se redujo a 0% en el grupo que recibió *C. sakazakii* y sobrenadante LGG (Tabla 3B). Los grupos de control de sobrenadante LGG y RPSI tuvieron solo una muerte en un total de 112 animales.

Discusión

[0084] Se ha demostrado que los probióticos confieren protección contra los patógenos. Corr et al (2007, Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(18): 7617) encontraron la producción de una bacteriocina, un péptido antibacteriano producido por el *Lactobacillus salivarius*, como un mecanismo potencial contra la *Listeria monocytogenes*. Aunque estudios previos han demostrado que los probióticos pueden prevenir la adhesión del *C. sakazakii* a células intestinales *in vitro*, ningún trabajo anterior se había enfocado en el potencial de LGG para prevenir o reducir la invasión por *C. sakazakii* *in vivo* en ratones neonatos. Sin embargo, se ha demostrado que el *Lactobacillus bulgaricus* es protector en un modelo de rata neonatal NEC, en el cual los cachorros fueron expuestos a *C. sakazakii* (Hunter, C. J., M. Williams, et al. 2009. *Lactobacillus bulgaricus* prevents intestinal epithelial cell injury caused by *Enterobacter sakazakii*-induced nitric oxid both *in vitro* and in the newborn rat model of necrotizing enterocolitis. *Infect Immun* 77(3): 1031). En el estudio actual, la administración de LGG y sobrenadante derivado de LGG antes y después de la exposición a *C. sakazakii* proporcionó un efecto protector, arrojando evidencia adicional de que los probióticos pueden prevenir la invasión por *C. sakazakii*. El LGG y el sobrenadante LGG redujeron de forma constante el aislamiento de *C. sakazakii* en los tejidos de los ratones neonatos.

[0085] La suplementación con LGG viable o sobrenadante redujo el porcentaje de animales con tejidos invadidos por *C. sakazakii*. Se encontró una relación no dependiente de la dosis entre *C. sakazakii* y su tasa de invasión; con todo, la tasa de invasión se redujo en los animales tratados con LGG y sobrenadante LGG. El *C. sakazakii* se encontró con mayor frecuencia en el tejido cerebral de los animales tratados.

[0086] La reducción de la invasión del tejido cerebral en los grupos que recibieron tanto *C. sakazakii* como LGG así como sobrenadante LGG es importante, porque la meningitis es la principal causa de morbilidad y mortalidad en las infecciones por *C. sakazakii*. En general, el porcentaje total de animales con tejidos invadidos por *C. sakazakii* se redujo en los grupos que recibieron tanto *C. sakazakii* como LGG así como sobrenadante LGG. El

27

actual estudio indica que el LGG, y/o su sobrenadante, limita el grado de invasión por *C. sakazakii* en los ratones neonatos.

[0087] Es interesante anotar que los grupos que recibieron *C. sakazakii* y *C. sakazakii* con LGG tuvieron una tasa de mortalidad ajustada similar (17% y 13%, respectivamente) y esta fue significativamente más alta que la de *C. sakazakii* con sobrenadante LGG (Tabla 3). Observamos que el LGG fue mucho más viscoso que el sobrenadante LGG, y este podría ser un factor contribuyente que tiene que ser tomado en cuenta en un estudio futuro. La baja tasa de mortalidad en el grupo de control con vehículo sugiere que la mayoría de las muertes en los grupos tratados con *C. sakazakii* fueron, en efecto, el resultado de la exposición al *C. sakazakii*.

CONCLUSIONES

[0088] El probiótico LGG y sus factores segregados recogidos durante el proceso de fermentación (LGG sobrenadante) redujeron la invasión global por *C. sakazakii* en ratones neonatos expuestos por vía oral a RPSI con dosis variables de *C. sakazakii*. De los tejidos examinados, el cerebro fue el invadido con mayor frecuencia por el *C. sakazakii*, pero también recibió la mayor protección del tratamiento con LGG o sobrenadante LGG. En el caso del cerebro, tanto el LGG como sobrenadante LGG fueron igualmente protectores contra la invasión por *C. sakazakii*. El sobrenadante LGG fue el más efectivo en la protección de los ratones neonatos contra la mortalidad relacionada con el *C. sakazakii*.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Una composición que comprende un sobrenadante del cultivo de una fase de crecimiento exponencial tardío de un proceso de cultivo de probióticos por lotes, para usar en el tratamiento o la prevención de la infección por un patógeno.
2. La composición de la reivindicación 1, que se caracteriza porque el probiótico es LGG.
3. La composición de la reivindicación 1, que se caracteriza porque el patógeno es *C. sakazakii*.
4. Una composición para usar en el tratamiento o la prevención de la infección por patógenos de acuerdo con la reivindicación 1, se puede obtener por un proceso que comprende las etapas de (a) someter un probiótico a cultivo en un medio de cultivo apropiado usando un proceso por lotes; (b) cosechar el sobrenadante del cultivo en una fase tardía de crecimiento exponencial de la etapa de cultivo, la cual fase se define con referencia a la segunda mitad del tiempo entre la fase de retardo y la fase estacionaria del proceso de cultivo por lotes; (c) opcionalmente remover constituyentes de bajo peso molecular del sobrenadante con el objeto de retener constituyentes de peso molecular por encima de 5 kDa; (d) remover el contenido líquido del sobrenadante del cultivo para así obtener la composición.
5. La composición de la reivindicación 4, que se caracteriza porque el probiótico es LGG y el patógeno es *C. sakazakii*.
6. La composición de la reivindicación 5, que se caracteriza porque la fase exponencial tardía se define con referencia al último cuarto del tiempo entre la fase de retardo y la fase estacionaria del proceso de cultivo por lotes.
7. La composición de la reivindicación 1, que se caracteriza porque el cultivo por lotes se lleva a cabo en un medio de cultivo desprovisto de polisorbato.
8. La composición de la reivindicación 7, que se caracteriza porque el medio contiene un ingrediente seleccionado de entre el grupo compuesto por ácido oleico, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de colza, aceite de girasol, y mezclas de los mismos.
9. La composición de la reivindicación 4, que se caracteriza porque el cultivo por lotes se lleva a cabo a un pH de 5-7.
10. La composición de la reivindicación 1, la cual comprende un sucedáneo de la leche materna o composición o suplemento nutricional prenatal, para bebé o para niños, un alimento médico, o un alimento para propósitos médicos específicos.

49

RESUMEN DE LA REVELACIÓN

Una composición que comprende un sobrenadante del cultivo de una fase de crecimiento exponencial tardío de un proceso de cultivo por lotes para un probiótico como LGG, para usar en el tratamiento o la prevención de la infección por un patógeno como *C. sakazakii*.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0095940

Bogotá D.C., Septiembre 09 de 2014 - 14:01:21

RECIBIDO DE : CASTILLO GRAU & ASOCIADOS LTDA.

NI 800.098.704

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	658392184	09/09/2014	6.284.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-198811- -00000-0000

Fecha: 2014-09-09 14:13:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 42

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Septiembre 9 de 2014 - 14:01:22



42

No. 14-198811- -00000-0000

Fecha: 2014-09-09 14:13:21

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI 30

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 42

PATENTE DE INVENCION ☐

MOI

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐