



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 149**

51 Int. Cl.:
A61K 35/12 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04790307 .5**
96 Fecha de presentación : **12.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1675601**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2006**

54 Título: **Moderación del efecto de las endotoxinas.**

30 Prioridad: **13.10.2003 EP 03023016**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2009

73 Titular/es: **Nestec S.A.**
avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es: **Corthesy-Theulaz, Irène;**
Fotopoulos, Grigórios y
Bergonzelli, Gabriela

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 328 149 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

Moderación del efecto de las endotoxinas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método nutritivo para la moderación del efecto de las enterotoxinas resultantes de la infección por agentes patógenos.

10 **Antecedentes de la invención**

El tracto gastrointestinal humano y animal tiene el riesgo de desarrollar varios trastornos incluyendo los causados por el envejecimiento, los virus, las bacterias y/o sus toxinas o por abusos físicos y químicos, entre otros.

15 Existen varios factores o terapias, los cuales son capaces de aliviar los síntomas de varios trastornos gastrointestinales. Entre otros, la flora indígena, conocida como microbiota, juega un importante papel en la modulación del ambiente intestinal. Los microorganismos no patogénicos residentes en el intestino, conocidos como probióticos, juntamente con las moléculas prebióticas, liberadas de los microorganismos o tomadas con la dieta como ingredientes alimenticios, presentan unos medios potenciales para prevenir o tratar los trastornos gastrointestinales, incluyendo la infección por *C. difficile*.

20 Se ha demostrado que las bacterias intestinales humanas modulan la producción de la toxina A de la *C. difficile*, en el intestino, y que la toxina A, se une más sobre las membranas intestinales aisladas del ratón axénico que en el ratón convencional, lo cual implica que los microorganismos indígenas juegan un importante papel en la patogénesis en la *C. difficile*. Estudios clínicos que ensayan métodos nutritivos para el tratamiento de la colitis y diarrea inducida por la *C. difficile*, indican que el *Lactobacillus GG* aumenta los síntomas de la colitis en adultos o niños hospitalizados. De manera similar, la levadura no patogénica *Saccharomyces boulardii* ha sido demostrado que tiene efectos positivos en la prevención o tratamiento de la colitis y diarrea inducida por la *C. difficile* en adultos o niños. Además, la patente RU 2168915 describe el empleo de un producto de carne que comprende ratiros predeterminados de buey, tocino, hígado blanqueado de buey, “squash” o “pumpkin” (tipos de calabaza), y mantequilla como un producto alimenticio para curar o prevenir trastornos gastrointestinales en niños y personas débiles. Todas las observaciones anteriores indican que el campo de la intervención nutritiva contra la infección por *C. difficile* está todavía abierto.

30 **Resumen de la invención**

35 La presente invención se refiere al empleo de peptonas y/o extracto de carne en la elaboración de una composición oral para el tratamiento de defectos de la integridad epitelial del intestino y/o la diarrea inducida por la enterotoxina producida por agentes patógenos.

40 **Descripción detallada de la invención**

En la presente solicitud, (“composición oral”) significa una composición ingerible, y puede ser una composición nutritiva, un suplemento nutritivo, o una medicina. Puede ser también el coadyuvante de un tratamiento médico, por ejemplo. Se pretende que se emplee en humanos, desde niños o predenominados niños, hasta personas mayores, que sufren los efectos de enterotoxinas que resultan de la infección por agentes patógenos. Se pretende emplearlos también para animales domésticos, tales como gatos, perros, peces, conejos, ratones, hamsters y similares, y más generalmente para cualquier animal cuidado por los humanos, como por ejemplo, caballos, vacas, aves de corral, ovejas, etc., que sufre los efectos de las enterotoxinas resultantes de la infección por agentes patógenos.

45 La expresión “extracto de carne” se pretende que abarque los extractos de cualquier carne, tal como buey, tocino, cordero, pollo y/o pavo, entre otros. Puede ser también una mezcla de las carnes antes citadas. En cualquier caso, suministran por lo menos, nitrógeno, aminoácidos, y carbono. Un ejemplo de un extracto de carne comercialmente disponible, adecuado, para emplear en la presente invención es el extracto de buey BD Bacto, suministrado por la firma Becton Dickinson and Company.

50 La expresión “extracto de levadura”, puede incluir la parte soluble en agua de la levadura autolisada, y de preferencia contiene complejos de vitamina B. Se pretende también que abarque un extracto que comprende tanto las partes solubles como las insolubles de la levadura de panadero autolisada, y en este caso se prefiere que comprenda además riboflavina y ácido pantoténico. Sin embargo, en la versión preferida de la presente invención, la expresión “extracto de levadura” no abarca el microorganismo y no comprende las enzimas producidas por el microorganismo. El extracto de levadura puede ser un extracto de *Saccharomyces cerevisiae*. Un ejemplo de un extracto de levadura comercialmente disponible, adecuado, para emplear en la presente invención es el extracto de levadura BD Bacto, fabricado por la firma Becton Dickinson and Company.

55 El término “peptona” significa una mezcla soluble de productos producidos por la hidrólisis enzimática o ácida parcial, de un material proteínico. La elección de la proteína del material de partida, no es crítica, pero la caseína, el suero de leche y las proteínas de carne son las preferidas. De preferencia, los pesos moleculares de las peptonas son inferiores a 3 kDa. Un ejemplo de una peptona comercialmente disponible, adecuada, para emplear en la presente invención es la peptona BD Bacto fabricada por la firma Becton Dickinson and Company.

Las enterotoxinas son exotoxinas bacterianas que tienen una acción sobre la mucosa intestinal. Pueden ser producidas en el interior del intestino por bacterias patógenas. Las enterotoxinas bacterianas son potentes inmunógenos de la mucosa que activan tanto las respuestas inmunológicas de la mucosa como las sistémicas, y así por lo tanto son la causa de varias enfermedades, que abarcan el envenenamiento de la comida, la diarrea común, la colitis, la inflamación crónica y la disentería. Las enterotoxinas conducen también a una seria ulceración de la mucosa, exudación hemorrágica inflamatoria o diarrea sanguínea. Las enfermedades inducidas por las toxinas van a menudo acompañadas de calambres abdominales y dolor rectal. Las enterotoxinas son los principales estimuladores de la secreción de fluido y de la inflamación intestinal. Su unión sobre la superficie de las células epiteliales conduce a la disgregación de la actina filamentososa y a una mayor permeabilidad de las junturas herméticas así como también a la activación de las rutas intracelulares y la subsiguiente síntesis y liberación de activadores de secreción de fluido. Las toxinas inducen también una grave inflamación, habitualmente caracterizada por la transmigración de neutrófilos a la mucosa, y la necrosis de enterocitos, por medio de la activación de nervios entéricos sensoriales y la liberación de neuropéptidos sensoriales, seguido por la liberación de citocinas y destrucción de células epiteliales.

Las bacterias patógenas pueden ser parte de la micro flora comensal, es decir que puede existir en el intestino sin un efecto dañino a no ser que y hasta que, el equilibrio de la microflora se trastorna, como puede suceder por ejemplo, durante el tratamiento con antibióticos, particularmente antibióticos de amplio espectro. En tales circunstancias, estos “patógenos oportunistas” pueden crecer rápidamente llegando a dominar la microflora intestinal y producir toxinas que causan la enteritis. Ejemplos de dichas bacterias incluyen la *Clostridium difficile* y la *Clostridium perfringens*, y las composiciones de la invención son particularmente bien adecuadas para controlar los efectos de las toxinas producidas por dichas bacterias. Se apreciará que la invención es por lo tanto particularmente adecuada para emplear en el tratamiento de infecciones hospitalarias.

Ejemplos de otras bacterias productoras de enterotoxinas son *E. coli*, *Leishmania donovani*, *Vibrio cholera*, *Salmonella typhimurium*, *Shingellae*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* o *Bacteroides fragilis* (ETBF), enterotoxigénico.

La infección por *Clostridium difficile* es la principal causa de colitis y diarrea en pacientes hospitalizados, cuya microbiota intestinal está alterada debido a la ingestión de antibióticos. La *C. difficile* causa enteritis debido a la liberación de dos enterotoxinas: la toxina A y la toxina B. Ambas toxinas tienen un potente efecto citotóxico en los humanos, pero la toxina A es el principal estimulador de la secreción de fluido (por lo tanto diarrea) e inflamación intestinal. La toxina A se une sobre la superficie de las células epiteliales y se internaliza dentro del citoplasma en hoyos recubiertos. La internalización conduce a una desasociación de las fibras de estrés de actina, a la disrupción de la placa de adhesión asociada a la actina, a la apertura de las junturas herméticas, a la separación de las células y al aumento de la secreción de fluido. Estos efectos han sido demostrados *in vitro* sobre líneas celulares epiteliales humanas cultivadas, tales como la línea celular colónica T84, en donde la adición de la toxina A sobre la monocapa disminuye la resistencia transepitelial y aumenta la permeabilidad de la monocapa. Las enterotoxinas de la *C. difficile in vivo* se ha demostrado que inducen una grave inflamación, caracterizada por la transmigración de neutrófilos en la mucosa y necrosis de enterocitos, cuando el íleo de la cobaya, conejo o rata se somete a la toxina A. El mecanismo que conduce a esta respuesta inflamatoria aguda parece ser la activación de los nervios entéricos sensoriales y la liberación de neuropéptidos sensoriales. Recientes estudios han propuesto también que la toxina A desregula la expresión del COX-2 en el intestino.

Una de las consecuencias más comunes de los daños causados por los patógenos gastroentéricos es la diarrea. La diarrea es el resultado del aumento de secreciones de las células epiteliales en el intestino, el cual puede ser inducido por las bacterias patógenas (incluyendo las bacterias productoras de enterotoxinas), parásitos o virus.

La COX-2 es una enzima que cataliza la síntesis de las prostaglandinas del ácido araquidónico. Otros sustratos conocidos para la COX-2 incluyen el ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3n:6) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), que producen PGE₁ y PGE₃ respectivamente. El gen de la COX-2 humana ha sido clonado y su modelo genómico y la capacidad de respuesta de su expresión génica a diferentes elementos tales como cAMP, NF-κB y TGF-β, IL-1 ó TNF-α, ha sido descrita.

La COX-2 está vinculada a numerosas inflamaciones, incluyendo las reacciones alérgicas y las inflamaciones del intestino. Entre las inflamaciones y trastornos del intestino, en donde la actividad de la COX-2 está implicada, están la gastritis, la enfermedad del intestino inflamado, el síndrome del intestino irritable, o los cánceres intestinales.

De preferencia, las peptonas se administran en forma de una composición oral, que comprende en volumen, del 0,3 al 7% de peptonas. Las fuentes adecuadas de peptonas incluyen la proteína del suero de leche y se prefiere particularmente una proteína de suero de leche extensamente hidrolizada, con un tamaño medio de péptido no mayor de cinco aminoácidos, aunque pueden también emplearse las proteínas del suero de leche con un grado de hidrólisis entre 15 y 20%. Las proteínas de la carne son una fuente alternativa de peptonas y entre las proteínas de la carne se prefieren las proteínas de buey. El extracto de carne puede añadirse, de preferencia en una cantidad de 0,3 a 7,0% en volumen. En la versión preferida, la composición oral comprende (en volumen) un 1% de extracto de carne y 1% de peptonas. Además, la composición puede incluir extracto de levadura, de preferencia a una concentración de 0,01 a 5% en volumen.

ES 2 328 149 T3

La composición oral de la invención puede tomar la forma de varios productos alimenticios diferentes. Por ejemplo puede ser una fórmula en polvo para niños, cuando la población objetivo es una población infantil. Puede también ser, productos alimenticios deshidratados, tales como sopas. Puede ser además una composición entérica o fórmulas de suplemento. Cuando el individuo que padece un trastorno intestinal es un animal doméstico, la composición oral puede ser cualquier pienso para animales domésticos húmedo o seco.

Cuando la composición, de acuerdo con la invención, se incorpora a una medicina, puede incorporarse juntamente con un excipiente apropiado en cualquier forma medicinal.

Hemos descubierto que cuando se ingieren extractos de carne juntamente o no, con peptonas, o solamente peptonas, los individuos que padecen una infección por agentes patógenos, evidenciada por un fallo de la integridad epitelial del intestino, y/o diarrea, tienen una secreción de fluido normalizada, una estructura celular menos dañada, y una inflamación menor, si se compara con individuos que tienen los mismos trastornos, pero una dieta no suplementada con extractos de carne ni peptonas.

En el marco de la presente invención, los extractos de carne y/o peptonas pueden también asociarse con extracto de levadura para obtener un efecto mejor sobre la integridad del intestino en los individuos sometidos a trastornos, daños y tensiones en el intestino.

20 Ejemplos

Ejemplo 1

Efecto de la composición sobre juntas impermeables y filamentos de actina

Material y métodos

Se cultivó la línea celular colónica humana T84 (ATCC, CCL-248) en DMEM:F12 1:1, suplementado con un 20% de FBS (suero bovino fetal), 2 mM de glutamina y 100 U/ml de penicilina - estreptomycin. Se cultivaron fibroblastos primarios de piel humanos, en DMEM suplementado con un 10% de FBS y 100 U/ml de penicilina - estreptomycin.

Se sembraron monocapas de T84, en placas con insertos de 6 pocillos con $0,5 \times 10^6$ células/inserto, y se cultivaron durante 3 semanas. Se midió el valor basal de la TEER (resistencia eléctrica transepitelial), y el medio de cultivo se substituyó por el 20% de una solución del medio de crecimiento Man-Rogosa-Sharpe (una solución conteniendo 1% de extracto de buey, 1% de peptonas de carne, y 0,5% de extracto de levadura en PBS, el cual se llamará de ahora en adelante "MRS"). Después de 1 hora a 37°C, se añadió la toxina A de la *C. difficile* a la cara apical de las monocapas a una concentración final de 100 ng/ml, y además se midieron las TEER después de 1, 2, 4, 6 y 24 horas a 37°C. Las monocapas de control se sometieron solamente a los medios cultivados. Para cada condición se emplearon insertos por triplicado. En cada momento puntual, se recogieron 1 ml de medio apical y 1 ml de medio basolateral, y se evaluó la viabilidad de las células mediante la medición de la liberación de LDH, empleando el Kit de Detección de Citotoxicidad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células T84 ó los fibroblastos primarios humanos (2×10^5 /cámara) se sembraron en porta objetos de vidrio de 4 cámaras, se hicieron crecer como se ha descrito previamente y se incubaron con una solución al 20% de MRS durante 1 hora antes de la adición de la toxina A a una concentración final de 500 ng/ml. Después de 6 horas, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 3,7%, se lavaron dos veces con PBS, se permeabilizaron durante 5 minutos a -20°C con acetona y se trataron con PBS-1% de BSA (albúmina de suero bovino) para reducir el marcado no específico. La disgregación de la actina y el redondeado de las células fueron dictaminados mediante microscopía fluorescente después del marcado con 200 U/ml de falotóxina marcada con rodamina.

Resultados

La toxina A afecta las juntas herméticas de las células epiteliales, un efecto que se mide por el decrecimiento de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las monocapas epiteliales. Para dictaminar si las MRS contrarrestarían la virulencia de la toxina A, las monocapas de T84 se sometieron a la toxina A en presencia o ausencia de la composición, y se midió la TEER. La adición de 100 ng/ml de la toxina A a las monocapas de T84, dió como resultado una reducción de 3 veces los valores del control de TEER después de 6 horas de incubación (309 ± 8 frente a 985 ± 49 Ωcm^2). La adición de una solución al 20% de MRS juntamente con la toxina A, evitó la disminución de la TEER (1403 ± 95 frente a 309 ± 8 Ωcm^2), mientras que no alteró los valores basales de la TEER de las células T84 (1217 ± 277 Ωcm^2 frente a 985 ± 49 Ωcm^2). No se observaron modificaciones en la viabilidad de las células, lo cual indicó que la toxina A no había inducido la muerte de las células durante el período de 6 horas. Los resultados anteriores demuestran que una mezcla de peptonas, extracto de carne, y extracto de levadura podrían contrarrestar la toxina A y proteger las monocapas de T84 de la disminución de la TEER inducida por la toxina A.

Para determinar si el efecto de protección de la MRS contra la disminución de la TEER inducida por la toxina A, era correlativa a la alteración del citoesqueleto que conducía al redondeado de las células, se trataron células T84 con la toxina A, sola o en combinación con una solución al 20% de MRS, y se analizó la actina del citoesqueleto mediante inmunocitoquímica. La adición de 500 ng/ml de toxina A, indujo el redondeado de las células T84 lo cual se evidenció

por el aspecto de nido de abeja de la monocapa celular debido a la disgregación de la actina y al empaquetamiento. La adición de una solución al 20% de MRS en combinación con la toxina A, previno parcialmente la disgregación de la actina y el subsiguiente redondeado de las células inducido por la toxina A, mientras que no influyó el citoesqueleto de las células cuando se añadió sola. Estos efectos fueron muy visibles debido a la configuración espacial de la monocapas de T84. Para hacer más fácil la interpretación, se repitieron los experimentos empleando fibroblastos primarios de piel humana, los cuales forman una monocapa plana. Después de 6 horas en presencia de la toxina A, todos los fibroblastos presentaron una apariencia redondeada indicando una completa disrupción del citoesqueleto. La adición de una solución al 20% de MRS en combinación con la toxina A, previno parcialmente la disgregación de la actina y el redondeamiento de las células. La forma de los fibroblastos tratados con toxina A y el 20% de la composición fue similar pero no idéntica a la forma de los fibroblastos de control o de los fibroblastos tratados con la combinación sola. Así por lo tanto, la MRS pudo contrarrestar la toxina A, evitando parcialmente las alteraciones citoesqueléticas y el subsiguiente redondeamiento de las células, debido a la disgregación de la actina.

Estos experimentos se repitieron a continuación, substituyendo la solución de MRS al 20% por las siguientes soluciones:

solución al 20% de una solución al 1% de peptonas de buey

solución al 20% de una solución al 1% de extracto de buey

solución al 20% de una solución al 0,5% de extracto de levadura

1% de una solución que contiene péptido de suero de leche extensamente hidrolizado (tamaño medio del péptido inferior a aproximadamente 5 aminoácidos)

10% de una solución que contiene péptidos de suero de leche extensamente hidrolizados (tamaño medio del péptido no mayor de 5 aminoácidos).

Resultados similares se obtuvieron con la solución al 20% de MRS.

Discusión

Los mecanismos de la acción protectora observados en la presente no están claramente explicados y probablemente son diferentes. La toxina A induce la polimerización de los filamentos de actina, conduciendo a la disgregación de la actina citoesquelética. La disrupción de la actina es la causa del redondeamiento de las células, observado *in vitro*, y del aumento de la permeabilidad de las juntas herméticas. El efecto de la toxina A sobre la actina se debe a su actividad glucotransferasa contra la familia Rho de proteínas. La toxina A es capaz de transferir enzimáticamente un radical glucosilo de la glucosa UDP a la treonina 37 de Rho, Rac y Cdc-42, conduciendo a una disociación de las fibras de estrés de actina, disrupción de la placa de adhesión asociada a la actina, abertura de las juntas herméticas, separación celular y aumento de la secreción de fluido. Estos efectos han sido demostrados *in vitro* sobre células T84, en donde la adición de toxina A sobre la monocapa disminuyó la resistencia transepitelial y aumentó la permeabilidad de la monocapa, debido a modificaciones de las proteínas Rho en las células epiteliales. Por lo tanto creemos que las peptonas, el extracto de levadura, y el extracto de buey interfieren con la ruta señalizadora de las proteínas Rho, inhibiendo los efectos de la toxina A. Aunque no deseamos unirnos a ninguna teoría, esta interferencia podría ser corriente arriba o corriente abajo, de la transferencia del radical glucosilo a las proteínas Rho.

Ejemplo 2

Efecto de la composición sobre los daños ocasionados por agentes patógenos gastroentéricos productores de enterotoxina

Material y métodos

Ratones machos de seis semanas de edad, se trataron *ad libitum* con 60 mg/litro de gentamicina, 250 mg/litro de vancomicina, 300 mg/litro de amoxicilina y 10 mg/litro de anfotericina, durante una semana con el fin de eliminar la microbiota intestinal. Los ratones se dividieron a continuación en tres grupos: i) un grupo de control; ii) un grupo que recibió *ad libitum* una solución al 20% de MRS en el agua de la bebida, durante una semana; y iii) un grupo que fue alimentado por sonda dos veces con 500 μ l de la composición a intervalos de dos días. El día después del final de los tratamientos, los animales se anestesiaron con 30 mg/kg de peso corporal de pentobarbital de sodio, y se colocaron sobre una manta caliente (37°C), bajo anestesia de 0,8-3% de isoflurano durante toda la duración de la operación. El abdomen se abrió mediante una incisión lineal central, y se extrajo el yeyuno distal. Dos segmentos de 5 cm del yeyuno, se ligaron doblemente en cada extremo con hilo quirúrgico para formar dos asas intestinales con un intervalo de 2 cm entre los mismos. Una de las asas se inyectó con 600 μ l de PBS como control y la otra con 600 μ l de PBS conteniendo 20 μ g de toxina A. El asa intestinal se volvió a colocar a continuación en la cavidad abdominal y la incisión se cerró con una sutura. Los ratones se dejaron recuperar y se hizo un seguimiento continuamente. Los animales fueron eutanizados después de 4 horas, las asas se aislaron y se registró el ratio entre su peso y la longitud (en mg/cm), para estimar la secreción de fluidos. Las asas se lavaron a continuación dos veces con PBS enfriado con hielo, se sumergieron en RNAlater™, se congelaron con un flash de nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Resultados

La infección por *C. difficile*, que conduce a la diarrea y colitis, se desarrolla la mayor parte de las veces en pacientes de hospitales y hogares de personas de edad, que toman antibióticos y de esta forma se altera su microbiota intestinal. Para dictaminar si la composición de la invención y sus componentes pueden contrarrestar los efectos de la toxina A *in vivo*, se empleó un modelo de ratón. Para evitar las condiciones provocadas por la infección de *C. difficile* en humanos, los ratones se trataron durante una semana con antibióticos con la finalidad de alterar su microbiota intestinal. Un día después del final del tratamiento antibiótico, un grupo de ratones se trataron con una solución al 20% de MRS *ad libitum* durante una semana. Al final de este período, se formaron las asas intestinales, y se inyectaron con PBS ó 20 µg de toxina A. Después de 4 horas de incubación, las asas del ratón de control presentaron un aumento de la secreción de fluido cuando se inyectaron con toxina A, en comparación con las asas inyectadas con PBS (121,9 ± 31,7 mg/cm frente a 64,6 ± 13,5 mg/cm). Por contraste, en los ratones que recibieron el MRS durante una semana, no se observaron diferencias en la secreción de fluidos en las asas inyectadas con toxina A ó PBS (73,6 ± 8,3 mg/cm frente a 66,8 ± 10,8 mg/cm). Similares resultados se obtuvieron cuando los ratones fueron alimentados por sonda con dos dosis de 500 µl de la solución de MRS al 20%. Estos resultados mostraron que el tratamiento con peptonas, el extracto de carne y el extracto de levadura pueden prevenir el efecto adverso de la toxina A en individuos que presentan un deterioro de la microbiota intestinal.

Para determinar si la composición ejerce su acción protectora mediante la directa inactivación de la toxina A, se mezclaron la solución de MRS al 20%, ó el PBS como control, con la toxina A, 1 hora antes de la inyección de la mezcla en las asas intestinales de los ratones, tratados durante una semana con antibióticos. No había ninguna diferencia significativa registrada entre el control (PBS) y las asas inyectadas con MRS a nivel de la secreción de fluido inducida por la toxina A. Este resultado indica que la composición no contrarresta los efectos de la toxina A mediante la directa unión e inactivación de la toxina, lo cual podría conducir o bien a una escisión de la toxina o al enmascaramiento de los epitopos de unión de la toxina.

Discusión

La composición MRS protegió al ratón de la secreción de fluido intestinal inducida por la toxina A. Aunque no deseamos unirnos a ninguna teoría, creemos que la acción protectora de la peptona, el extracto de buey, y el extracto de levadura, no se debe a una actividad enzimática, la cual escinde la toxina A por dos razones principales: i) las soluciones empleadas fueron siempre esterilizadas en autoclave, lo cual conduciría a la desactivación de cualquier enzima, tal como las proteasas contenidas en la solución, y ii) la composición mezclada e incubada con la toxina A antes de ser inyectada en las asas intestinales del ratón, podría no inhibir la secreción de fluido intestinal. Por lo tanto, creemos que la actividad protectora de la peptona, del extracto de levadura, y del extracto de buey se debe a la presencia de moléculas libres en la solución (por ejemplo aminoácidos o péptidos), las cuales podrían unirse al receptor de la toxina A sobre las células epiteliales intestinales y evitar la unión de la toxina A, y la activación de las rutas de señalización implicadas.

Ejemplo 3

*Efecto de la composición sobre la expresión de la COX-2**Materiales y métodos*

Se empleó el mismo procedimiento del ejemplo número 2. Se extrajo el ARN de las asas intestinales del ratón, y se dictaminó la expresión del ARNm de la COX-2 mediante la RT-PCR. El ARN total (1 µg) se transcribió mediante transcripción inversa con 200 U de la enzima Superscript II[®]. Un fragmento de 400 bp de la COX-2 del ratón, se amplificó mediante la PCR empleando el 5'-CACAGTACACTACATCCTGACC-3' como cebador con sentido y el 5'-TCCTCGCTTCTGATTCTGTCTTG-3' como cebador antisentido. Un segmento de 700 bp de β-actina, empleado como control interno, se amplificó de la misma mezcla RT con el 5'-ATGAGGTAGTCTGTTCAGGT-3' como cebador con sentido y el 5'-ATGGATGACGATCGCT-3' como cebador antisentido. Para excluir la contaminación por ADN, la PCR se efectuó directamente sobre muestras de ARN. Los productos de la PCR se cargaron sobre un gel de agarosa al 1%, se fotografiaron, y las fotografías se emplearon para una cuantificación densitométrica de las intensidades de las bandas. La normalización se efectuó contra la expresión de la β-actina del control interno: se determinaron los ratios entre la COX-2 y las correspondientes señales del ARNm de la β-actina y se expresaron en relación al de la "muestra no tratada" (dada agua, e inyectados con PBS), a la cual se asignó un valor arbitrario de 1.

Resultados

Para determinar si la COX-2, conocida por estar implicada en la secreción de fluido mediada por la toxina A, está también implicada en el efecto protector de la composición, se dictaminó la expresión del ARNm de la COX-2, mediante la RT-PCR. Los cambios en la expresión de la COX-2 debidos a diferentes tratamientos, se expresaron con relación a la β-actina. La inyección de 20 µg de toxina A en las asas intestinales del ratón de control dio por resultado un aumento de 3,6 veces la expresión del ARNm de la COX-2. El tratamiento de los ratones durante una semana con la composición, dio por resultado una reducción de 2 veces el aumento de la COX-2 mediado por la toxina A. La expresión de la COX-2 intestinal inducida por la toxina A, se normalizó completamente a niveles basales en los ratones mediante tratamientos con peptona o extracto de buey, mientras que disminuyó 2,3 veces mediante el tratamiento con

extracto de levadura. Ni la composición ni sus componentes modificaron significativamente los niveles basales de la expresión del ARNm de la COX-2. Cuando se administró mediante una sonda, la composición o sus componentes fueron también capaces de contrarrestar el aumento del ARNm de la COX-2 inducido por la toxina A.

5 *Discusión*

10 Cuando la toxina A se une a las células epiteliales se ha demostrado que induce la inflamación, incluyendo la migración de los neutrófilos y la necrosis de los enterocitos y la destrucción del vello. Estos efectos están mediados por la liberación de neuropéptidos sensoriales, tales como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, seguido por la activación de los nervios entéricos sensoriales. Además, la expresión sobre el epitelio intestinal del receptor de NK-1R para la SP, aumenta significativamente tanto en animales como en humanos infectados con la *C. difficile*. Recientes estudios han propuesto que la toxina A de la *C. difficile* regula hacia arriba la expresión de la COX-2 en el intestino. La COX-2 es la isoforma inducida de la enzima ciclooxigenasa, la cual medía la síntesis de la prostaglandina E2 (PGE2), un agente conocido por aumentar la secreción del fluido intestinal, lo cual conduce a la diarrea. Aunque no deseamos unimos a ninguna teoría, creemos que la peptona, el extracto de levadura y el extracto de buey inhiben cualquiera de estas rutas contrarrestando la toxina A. Nuestros resultados indican que la peptona, el extracto de levadura o el extracto de buey, inhiben la inducción intestinal de la COX-2 mediada por la toxina. Esto podría ser debido a la inhibición de la señalización mediada por la toxina A, lo cual conduce a la activación de la COX-2, si nuestras soluciones inhiben o reducen la unión de la toxina sobre su receptor intestinal.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Empleo de peptonas y/o de un extracto de carne en la elaboración de una composición oral para el tratamiento de un defecto de la integridad epitelial intestinal y/o de la diarrea, inducidos por agentes patógenos que producen enterotoxinas.

10 2. El empleo de la reivindicación 1, en la cual el agente patógeno es: *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Leishmania donovani*, *Vibrio cholera*, *Salmonella typhimurium*, *Shingellae*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* y/o enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*.

3. El empleo de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición oral comprende de 0,3 a 7% en volumen de peptonas o extracto de carne.

15 4. El empleo de cualquier reivindicación precedente, en donde las peptonas son hidrolizados de proteína de suero de leche con un tamaño medio de péptido no mayor de 5 aminoácidos.

5. El empleo de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición oral comprende tanto peptonas como extracto de carne.

20 6. El empleo de la reivindicación 5, en donde la composición oral comprende de 0,3 a 7% en volumen de extracto de carne y de 0,3 a 7% en volumen de peptonas.

25 7. El empleo de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición oral comprende además extracto de levadura.

8. El empleo de la reivindicación 7, en donde la composición oral comprende de 0,01 a 5% en volumen de extracto de levadura.

30 9. El empleo de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición oral es un coadyuvante para un tratamiento médico.

10. El empleo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición oral es una fórmula infantil o una composición entérica.

35

40

45

50

55

60

65