

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 864**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05788495 .9**
96 Fecha de presentación: **21.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1796698**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Cepa de Lactobacillus acidophilus que tiene propiedades analgésicas en el sistema gastrointestinal**

30 Prioridad:
21.09.2004 FR 0409966

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.03.2012

73 Titular/es:
DANISCO A/S
LANGEBROGADE 1, P.O. BOX 17
1001 COPENHAGEN K., DK

72 Inventor/es:
DESREUMAUX, Pierre y
CARCANO, Didier

74 Agente/Representante:
Veiga Serrano, Mikel

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).

ES 2 376 864 T3

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Lactobacillus acidophilus* que tiene propiedades analgésicas en el sistema gastrointestinal

5 Sector de la técnica

Entre los microorganismos, en particular entre las bacterias, algunos tienen una influencia positiva en el sistema inmunitario, en particular las bacterias lácticas y las bifidobacterias, y se describen como bacterias o cepas "probióticas".

10 En general, con bacteria o cepa probiótica se quiere decir un microorganismo no patógeno que, ingerido vivo, ejerce un efecto beneficioso sobre la salud o la fisiología del huésped. Estas cepas probióticas tienen en general la capacidad de sobrevivir al paso a través de la parte superior del tubo digestivo. No son patógenas, no son tóxicas y ejercen su efecto beneficioso sobre la salud, por una parte a través de interacciones ecológicas con la flora residente en el tubo digestivo, y por otra parte a través de la capacidad de influir en el sistema inmunitario de manera positiva a través de "GALT" (tejido linfóide asociado al intestino). Dependiendo de la definición de los probióticos, estas bacterias, cuando se administran en un número suficiente, tienen la capacidad de avanzar vivas a través del intestino, sin embargo no atraviesan la barrera intestinal y por tanto sus principales efectos se sienten en la luz y/o en la pared del tubo digestivo. Entonces forman parte de la flora residente durante el periodo de administración. Esta colonización (o colonización temporal) permite que las bacterias probióticas ejerzan un efecto beneficioso, tal como la represión de microorganismos potencialmente patógenos presentes en la flora e interacciones con el sistema inmunitario del intestino.

25 Las cepas probióticas más usadas, en particular en productos lácteos, son principalmente bacterias y levaduras de los siguientes géneros: *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Sacharomyces spp.* Entre los efectos probióticos registrados para estas bacterias, pueden mencionarse por ejemplo la mejora de la tolerancia a la lactosa, la prevención o el tratamiento de infecciones gastrointestinales y genitourinarias, la reducción de cánceres, la reducción del nivel de colesterol en sangre. Sin embargo, debe hacerse hincapié en que no todas las cepas de los géneros descritos anteriormente, tomadas individualmente, tienen estos efectos, sino sólo algunos de ellos, que deben seleccionarse cuidadosamente.

Con el fin de cumplir los requisitos de los industriales, se ha hecho necesario encontrar cepas o mezclas de cepas que sean eficaces y que posibiliten proporcionar una solución al dolor experimentado a nivel gastrointestinal, y que a menudo se expresa como malestar intestinal, en particular el síndrome del intestino irritable (IBS), o dolor producido por inflamación a nivel gastrointestinal, en particular durante la colitis o la diarrea.

Estado de la técnica

40 El documento WO 03/013558 da a conocer un método de tratamiento del dolor y el malestar de la colitis actínica que resulta de la terapia de radiación, comprendiendo dicho método administrar a una persona que necesita dicho método una cantidad eficaz de una composición farmacéutica o dietética probiótica que comprende estreptococos, lactobacilos y bifidobacterias protectores seleccionados del grupo que consiste en *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium bifidum* en una cantidad diaria de desde al menos 100×10^9 hasta 3.600×10^9 células bacterianas.

Objeto de la invención

50 Por tanto, el problema que propone resolver la presente invención es proporcionar una cepa de bacterias probióticas que tiene propiedades analgésicas.

Para este fin, la presente invención propone el uso de al menos una cepa de *Lactobacillus acidophilus* para preparar un soporte administrado a seres humanos o animales para un fin analgésico en el sistema gastrointestinal.

55 La presente invención se define por las reivindicaciones.

La invención también propone un procedimiento *in vitro* para seleccionar un microorganismo para preparar un soporte administrado a seres humanos o animales para un fin analgésico en el sistema gastrointestinal que comprende las siguientes fases:

60 i) llevar el microorganismo que va a someterse a prueba en contacto con al menos una célula epitelial;

ii) detectar la expresión de los receptores opioides y/o receptores cannabinoides en al menos una célula epitelial;

65 La invención tiene la ventaja de proponer virtudes que son indiscutibles y que ampliarán el ámbito de las cepas disponibles.

La invención tiene otra ventaja, la de poder usarse para un fin terapéutico o profiláctico en el sistema gastrointestinal.

5 La invención es particularmente ventajosa cuando se administra a seres humanos o animales para un fin terapéutico o profiláctico en el sistema gastrointestinal, en particular en la reducción del dolor experimentado en el caso del síndrome del intestino irritable o en el caso del dolor producido por reacciones inflamatorias o en la regulación de la inflamación intestinal.

10 La invención también es ventajosa ya que posibilita regular el tránsito intestinal modulando la secreción y la motricidad digestiva, cuando se administra a seres humanos o animales para un fin terapéutico o profiláctico.

La presente invención también tiene la ventaja de conservar todas sus propiedades cuando se incorpora en un soporte farmacéuticamente aceptable o en un producto alimenticio.

15 Otras ventajas y características de la invención aparecerán más claramente con la lectura de la descripción y los ejemplos siguientes facilitados meramente como ilustración y no como limitación.

Un objeto de la presente invención es el uso de al menos una cepa de *Lactobacillus acidophilus* para preparar un soporte administrado a seres humanos o animales para un fin analgésico en el sistema gastrointestinal.

20 El *Lactobacillus acidophilus* usado según la invención es una cepa Gram positiva. Ventajosamente, es una cepa catalasa negativa, con un metabolismo homofermentativo que da lugar a la producción de ácido láctico.

25 El *Lactobacillus acidophilus* usado según la invención también puede producir una bacteriocina, tal como por ejemplo lactacina, activa frente a otros microorganismos.

Preferiblemente, es un *Lactobacillus acidophilus* que tiene una buena resistencia a pepsina, en condiciones de pH ácido, una buena resistencia a pancreatina y una buena tolerancia a las sales biliares.

30 Preferiblemente, se usará un *Lactobacillus acidophilus* descrito como "hidrófobo", es decir uno que tiene una fuerte afinidad por disolventes orgánicos hidrófobos polares o no polares, tales como por ejemplo n-decano, cloroformo, hexadecano o xileno.

35 Las cepas de *Lactobacillus acidophilus* preferidas según la invención son *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797 y *Lactobacillus acidophilus* NCFM. La cepa de *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797 de *Lactobacillus acidophilus* se ha registrado por Rhodia Chimie, 26, quai Alphonse Le Gallo, 92 512 BOULOGNE-BILLANCOURT Cedex Francia, según el Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), en la que se registró con el número de registro PTA-4797. Esta cepa se da a conocer en el documento WO2004052462.

40 Dentro del marco del presente uso según la invención, la analgesia en el sistema gastrointestinal está mediada ventajosamente por los receptores opioides y/o receptores cannabinoides.

45 Los receptores opioides descritos son tres: δ , κ y μ . Pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G que están compuestos por siete hélices transmembrana. La parte intracelular del receptor está en contacto con la proteína G que está asociada con él y que puede variar dependiendo del tipo de agonistas usados, pero que predominantemente son las proteínas $G\alpha_{i3} > G\alpha_{i2} > G\alpha_{i1}$.

50 Los receptores opioides, en particular el receptor μ , tienen varias funciones. La principal es un papel analgésico demostrado por el uso de agonistas de tipo β -endorfina o morfina específicos para este receptor que atraviesan la barrera hematomeníngea. La segunda función del receptor en el tubo digestivo es reducir el tránsito intestinal inhibiendo la secreción y la motricidad digestiva. Finalmente, los receptores opioides también están implicados en la regulación de la inflamación intestinal. El receptor μ para los opioides está presente en el sistema nervioso central pero también en la periferia. Su presencia se ha detectado en la mayoría de los órganos vitales del cuerpo humano: bazo, hígado, riñones, intestino delgado y colon, en particular en el sistema nervioso intestinal, en las neuronas del plexo submucoso y mesentérico, pero también, *in vitro*, en linfocitos, monolitos/macrófagos y células epiteliales.

55 Los receptores cannabinoides, denominados CB1 y CB2, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G que están compuestos por siete hélices transmembrana. Se expresan esencialmente por el sistema nervioso central y periférico en el caso de CB1 y por las células de respuesta inmunitaria en el caso de CB2. En seres humanos, hay dos ligandos endógenos de estos receptores cannabinoides, que se producen de manera natural por las células epiteliales intestinales.

60 Los receptores cannabinoides CB1 expresados por el sistema nervioso entérico serían la causa de una ralentización del peristaltismo del estómago y el intestino delgado y de una inhibición de la secreción gástrica. Se suponen otras funciones antidiarreicas y anticancerígenas de los receptores cannabinoides.

65

Dentro del marco del presente uso según la invención, la analgesia en el sistema gastrointestinal está mediada preferiblemente por los receptores μ para opioides y/o los receptores CB1 y/o los receptores CB2.

5 El soporte empleado durante el uso según la invención es preferiblemente un soporte farmacéuticamente aceptable o un producto alimenticio.

Con soporte farmacéuticamente aceptable se quiere decir, entre otras cosas, un soporte en forma de comprimidos fabricados por compresión, comprimidos, cápsulas, pomadas, supositorios o disoluciones bebibles.

10 Preferiblemente, el soporte empleado durante el uso según la invención es un producto alimenticio tal como un complemento alimenticio, una bebida o un polvo a base de leche. Preferiblemente es un producto lácteo de origen animal o vegetal.

15 Con producto lácteo se quiere decir un medio que comprende leche de origen animal y/o vegetal. Como leche de origen animal puede mencionarse leche de vaca, oveja, cabra o búfala. Como leche de origen vegetal puede mencionarse cualquier sustancia que puede fermentarse de origen vegetal que puede usarse según la invención, en particular que tiene como origen, soja, arroz o cereales.

20 Todavía más preferiblemente, el soporte empleado según la invención es una leche fermentada o leche humanizada.

La cepa de *Lactobacillus acidophilus* usada para preparar un soporte según la invención puede estar en forma de una suspensión bacteriana, antes o tras su congelación, en forma de concentrados, o bien en forma seca, liofilizada o congelada. Cualquiera que sea la forma usa, la cepa puede congelarse.

25 La cepa de *Lactobacillus acidophilus* usada para preparar un soporte según la invención puede contener diferentes aditivos añadidos durante su secado o durante su liofilización.

30 La cepa de *Lactobacillus acidophilus* usada según la invención puede comprender desde 10^6 hasta 10^{12} UFC de bacterias/g de soporte, y más particularmente desde 10^8 hasta 10^{12} UFC de bacterias/g de soporte. UFC significa "unidades formadoras de colonias". Con gramo de soporte se quiere decir preferiblemente el producto alimenticio o el soporte farmacéuticamente aceptable, y preferiblemente de 10^9 a 10^{12} UFC/g para la forma liofilizada.

35 Un objeto de la invención es también un procedimiento *in vitro* para seleccionar un microorganismo para preparar un soporte administrado a seres humanos o animales para un fin analgésico en el sistema gastrointestinal que comprende las siguientes fases:

i) llevar el microorganismo que va a someterse a prueba en contacto con al menos una célula epitelial;

40 ii) detectar la expresión de los receptores opioides y/o receptores cannabinoides en al menos una célula epitelial.

45 La célula o células epitelial/epiteliales usada(s) durante las fases i) o ii) proceden preferiblemente de la línea celular ATCC HTB-38, denominada comúnmente línea HT-29 o de la línea celular Caco-2. Éstas son líneas celulares de cáncer de colon. También pueden ser células aisladas y purificadas a partir de biopsias de casos de operaciones en seres humanos.

La fase i) se lleva a cabo preferiblemente usando desde 10^8 hasta 10^{12} UFC de microorganismos que van a someterse a prueba con al menos una célula epitelial.

50 El periodo de contacto, usando la fase i), puede variar desde 0 horas hasta 24 horas, y es preferiblemente de 3 horas.

55 En general, la puesta en contacto con las células según la fase i) se lleva a cabo en condiciones normales de temperatura, atmósferas modificadas y esterilidad bien conocidas por un experto en la técnica, en particular en condiciones de cultivo de células epiteliales *in vitro*.

60 La fase ii) del procedimiento de selección según la invención se lleva a cabo detectando preferiblemente la expresión de los receptores μ para opioides (MOR) y/o los receptores CB1 y/o los receptores CB2. Normalmente, sólo puede detectarse la expresión de un receptor: MOR solo, el receptor CB1 solo o el receptor CB2 solo. Alternativamente, puede detectarse la expresión de dos receptores: MOR y receptor CB1; MOR y receptor CB2; receptor CB1 y receptor CB2. Alternativamente, puede detectarse la expresión de tres receptores: MOR, receptor CB1 y receptor CB2.

65 La fase ii) del procedimiento de selección según la invención se lleva a cabo detectando preferiblemente la expresión, y opcionalmente su nivel, del ARN mensajero de los receptores opioides y/o receptores cannabinoides, por ejemplo mediante PCR entre otros mediante PCR cuantitativa o mediante inmunohistoquímica. Pueden usarse

otras técnicas bien conocidas por un experto en la técnica para la detección de ARNm y su medición.

Descripción de las figuras

- 5 La figura 1 representa, como función del tiempo, la cinética de expresión del ARN mensajero de los receptores μ para opioides, expresados en las células epiteliales ATCC HTB-38 durante la estimulación por 4 microorganismos diferentes.
- 10 La figura 2 representa, como función del tiempo, la cinética de expresión del ARN mensajero de los receptores CB1, expresados en las células epiteliales ATCC HTB-38 durante la estimulación por 3 microorganismos diferentes.
- La figura 3 representa, como función del tiempo, la cinética de expresión del ARN mensajero de los receptores CB2, expresados en las células epiteliales ATCC HTB-38 durante la estimulación por 3 microorganismos diferentes.
- 15 La figura 4 representa la expresión del ARNm de MOR en condiciones diferentes.
- La figura 5 representa la expresión del ARNm de TNF alfa de colon en ratones no tratados y en ratones tratados con *L. acidophilus*.
- 20 La figura 6 representa la expresión de ARNm de KC de colon en ratones no tratados y en ratones tratados con *L. acidophilus*.
- La figura 7 representa la expresión de ARNm de IL-1 beta en ratones no tratados y en ratones tratados con *L. acidophilus*.
- 25 Las figuras 8, 10, 12 representan células epiteliales inmunoteñidas.
- Las figuras 9, 11, 13 representan el porcentaje de células epiteliales inmunoteñidas.
- 30 Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1

35 **1/ Preparación de las células epiteliales:**

Se pone en cultivo la línea celular de cáncer de colon HT-29 (ATCC HTB-38) en medio DMEM respectivamente con suero bovino fetal al 20 y al 10% a 37°C en una atmósfera que contiene CO₂ al 5%. La línea celular ATCC HTB-38 se lleva en contacto con las diferentes cepas de microorganismos que van a someterse a prueba durante 1; 3; 4; 8; 40 18 ó 24 horas. Entonces se recubren las células epiteliales ATCC HTB-38 y se sumergen en nitrógeno líquido con el fin de posibilitar la cuantificación del ARNm y de las proteínas de los receptores μ para opioides y/o receptores cannabinoides.

45 **2/ Detección y cuantificación de los ARN mensajeros de los receptores μ para opioides y/o los receptores cannabinoides:**

PCR en tiempo real:

50 Se aísla el ARN total de las líneas celulares epiteliales mediante el uso de un kit de extracción en columna (Macherey-Nagel). En resumen, se hacen crecer las células en tampón de lisis que contiene β -mercaptoetanol al 1%, luego se hacen pasar a un primer tipo de columna permitiendo la eliminación de todo el desecho. Tras el tratamiento con ADNasa, se somete el ARN a transcripción inversa dando lugar al ADN complementario amplificado por PCR en tiempo real (ABPrism 7000, Perkin) a una temperatura de hibridación de 60°C usando cebadores 55 específicos para los receptores μ para opioides o receptores cannabinoides:

- para los receptores μ para opioides (MOR) (Sentido: ATgCCAgTgCTCATCATTAC, Antisentido: gATCCTTCgAAgATTCTgTCCT) y para el gen de referencia: β -actina (S: TCACCCACACTgTgCCCATCTACgA, AS: CAgCggAACCgCTCATTgCCAATg);

60 - para los receptores cannabinoides CB1, Sentido: CCT AGA TGG CCT TGC AGA TAC C; CB1 Antisentido: TGT CAT TTG AGC CCA CGT ACA G; CB2 Sentido: GCT AAG TGC CCT GGA GAA CGT; CB2 Antisentido: TCA GCC CCA GCC AAG CT.

3/ Resultados:

Los resultados se presentan en las figuras 1 a 3. Los resultados se expresan por la razón entre el gen diana (β -actina) / receptores μ para opioides (MOR) y/o receptores cannabinoides (CB1, CB2).

- 5 Los receptores μ para opioides y/o receptores cannabinoides se expresan en la línea de células epiteliales ATCC HTB-38 (figuras 1 a 3).

Algunos microorganismos, tal como la cepa *Lactobacillus*, pueden inducir la expresión del ARNm de los receptores μ para opioides y/o receptores cannabinoides.

- 10 Los resultados muestran una inducción significativa de los receptores μ para opioides y/o receptores cannabinoides por las células epiteliales en cultivo.

Esta inducción es particularmente fuerte con la cepa *Lactobacillus acidophilus*.

- 15 Las figuras 1 y 2 muestran que tras una incubación de 3 horas de las células epiteliales con *Lactobacillus acidophilus*, se observa un aumento de aproximadamente 1000 veces en el nivel de expresión basal del ARNm de los receptores μ para opioides (figura 1) y CB1 (figura 2).

- 20 La figura 3 muestra que tras una incubación de 3 horas de las células epiteliales con *Lactobacillus acidophilus*, se observa un aumento de aproximadamente 100 veces en el nivel de expresión basal del ARNm de los receptores CB2 (figura 3).

A la inversa, no se detectó inducción de los receptores μ para opioides con una cepa de *E. coli* comensal (figura 1).

- 25 La inducción de los receptores opioides y/o receptores cannabinoides por la cepa de *Lactobacillus acidophilus* es del mismo orden de magnitud que la obtenida por el TNF- α a una dosis de 10 ng/ml.

Ejemplo 2**30 1/Materiales y métodos**

Cepa bacteriana. Se hizo crecer anaeróbicamente la cepa de *Lactobacillus acidophilus* NCFM según la presente invención en caldo deMan, Rogosa, Sharpe (MRS) (Becton Dickinson) durante la noche a 37°C. Para los experimentos *in vitro*, se usaron las bacterias cuando alcanzaron la fase exponencial. Se evaluaron los cultivos para determinar la pureza mediante tinción de Gram antes de la inoculación en un animal.

- 35 **Infección experimental y en animales.** Se realizaron experimentos con animales en establecimientos acreditados en el Instituto Pasteur de Lille según las directrices gubernamentales. Se alojaron cinco ratones Balb/c por jaula y se les dejó acceso libre a alimento para ratones convencional y agua corriente durante un ciclo de luz diurna de 12 horas. Los animales recibieron 10^9 UFC de la cepa de *Lactobacillus acidophilus*, que estaban resuspendidas en CMC al 0,5% (carboximetilcelulosa, Sigma), una vez al día mediante sonda gástrica durante catorce días. Se sacrificó a los animales mediante dislocación cervical. Se extirparon todos los colonos de los animales y se cortaron en dos partes. Una parte se fijó durante la noche en paraformaldehído al 4% - ácido y se incluyeron en parafina. La segunda parte del colon se usó para la cuantificación del ARNm del receptor μ opioide (MOR), de los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) y de las citocinas inflamatorias TNF α , KC, e IL-1 β .

- 45 **Inducción de colitis por TNBS y diseño del estudio.** Puesto que la expresión de MOR está regulada por la inflamación (Philippe D *et al*, JCI 2003; Pol O *et al*, Mol Pharmacol 2001; Pol O *et al*, Curr Top Med Chem 2004), se usó la colitis inducida por TNBS como control positivo. Se realizaron experimentos con animales en establecimientos acreditados en el Instituto Pasteur de Lille según las directrices gubernamentales. Se alojaron cinco animales por jaula y se les dejó acceso libre a alimento para ratones convencional y agua corriente. Para la inducción de la colitis, se anestesió a los ratones durante 90-120 minutos y recibieron una administración intrarrectal de TNBS (40 μ l, 150 mg/kg) disuelto en una mezcla 1:1 de NaCl al 0,9% con etanol al 100%. Los ratones control recibieron una mezcla 1:1 de NaCl al 0,9% con etanol al 100% o una solución salina usando la misma técnica. Se sacrificó a los animales 4 días tras la administración de TNBS.

PCR cuantitativa en tiempo real

- 60 Se aisló el ARN total de tejidos de colon completos usando el kit Rneasy (Macherey Nagel, Hoerd, Francia) según las instrucciones del fabricante. Se realizó la cuantificación del ARN usando espectrofotometría. Tras el tratamiento a 37°C durante 30 min. con 20-50 unidades de ADNasa I libre de ARNasa (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN, EE.UU.), se usaron cebadores de oligo-dT (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, EE.UU.) para sintetizar ADNc monocatenario. Se cuantificaron los ARNm usando SYBR green Master Mix (Applera, Courtaboeuf, Francia) con oligonucleótidos de ratón específicos (véase la tabla I), en un dispositivo GeneAmp

Abiprism 7000 (Applera, Courtaboeuf, Francia). En cada ensayo, se incluyeron controles calibrados y no de molde. Se analizó cada muestra por triplicado. Se analizó la intensidad del colorante SYBR usando el software Abiprism 7000 SDS (Applera, Courtaboeuf, Francia). Se normalizaron todos los resultados con respecto al gen de mantenimiento de β -actina no afectado.

5

Tabla I:

Genes	Secuencias de cebador (5' → 3')
β -actina	S: 5'-gggTCAGAAggATTCCTATg-3' AS : 5' ggTCTCAAACATgATCTggg-3'
MOR	S: 5' - CCG GCA GCC CTT CCA-3' AS: 5'- GAG GCC CAC TAC ACA CAC GAT -3'
CB1	S: 5' .GCC CGC ATG GAC ATT AGG-3' AS: 5'AGG GCC CCA GCA GAT GA -3'
CB2	S: 5' - CTC AAT TTT TCT GGT CCC TAT G-3' AS: 5-AGT CTG GCA CCG CTA AAC AAG-3'
TNF alfa	S: 5'-TgggAgTAgACAAGgTACAACCC-3' AS: 5' CATCTTTCTCAAAATTCgAgTgACAA-3'
IL-1 beta	S: 5'-gATCCACACTCTCCAgCTgCA -3' AS: 5'-CAACCAACAAGTgATATTCTCCATg-3'
KC	S: 5'-ggCgCCTATCgCCAATg-3' AS: 5'-CTggATgTTCTTgAggTgAATCC-3'

Inmunohistoquímica de MOR-CB1-CB2

- 10 Se realizó la inmunohistoquímica en secciones de colon incluidas en parafina de ratones que recibieron la cepa de *Lactobacillus acidophilus*. Se usaron animales no tratados como controles. Tras la permeabilización durante 5 min. en PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% a 4°C, se incubaron las secciones durante 15 min. con suero normal de cabra al 1,5 % y durante 15 min. con tampón de bloqueo (BSA al 1% en leche) para minimizar la adsorción no específica de los anticuerpos. Posteriormente se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario policlonal de conejo dirigido contra CB1 (1:200, Cayman Chemical, Ann Arbor, EE.UU.) o CB2 (1:10, Alpha Diagnostic, San Antonio, EE.UU.) o MOR (1:500, Diasorin, Antony, Francia) durante de 2 a 12 horas a temperatura ambiente. Entonces, se incubaron las secciones durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo Alexa 488 conjugado con fluorocromo FITC (dilución 1:100, Dako Laboratories, Trappes, Francia). Entre cada fase, se enjuagaron las secciones dos veces durante 5 min. en PBS que contenía Triton X-100 al 0,05%. Entonces se contratiñeron los portaobjetos con solución de Hoescht (0,125 mg/ml) y se montaron para microscopía. Los controles negativos consistieron en tinción con suero de conejo normal en lugar de con el anticuerpo específico. Se reveló la inmunofluorescencia con un microscopio de fluorescencia (Leica, Bensheim, Alemania). Se contó el número de células epiteliales inmunorreactivas con MOR, CB1 y CB2 en cinco campos de gran aumento (HPF) diferentes y se expresó por 100 células epiteliales.

25

2/Resultados:

Los resultados se presentan en las figuras 4 a 13.

- 30 **1) *Lactobacillus acidophilus* induce la expresión del ARNm de MOR in vivo en el colon de ratones** (figura 4).

Tras dos semanas de la administración de *Lactobacillus acidophilus* (10^9 UFC por día), se encontró un aumento de 24 veces de la expresión del ARNm de MOR en el colon en comparación con los animales no tratados ($p < 0,05$). Esta inducción del ARNm de MOR por la cepa de *Lactobacillus acidophilus* era más importante en comparación con la inducción de dos veces encontrada en los controles positivos correspondientes a colitis inducida por TNBS (figura 4).

35

2) *Lactobacillus acidophilus* induce la expresión in vivo de MOR, CB1 y CB2 en células epiteliales de colon de ratones

(figuras 8-13)

40

Para evaluar a nivel de traducción la inducción de MOR, CB1 y CB2, específicamente en células epiteliales de colon, se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos específicamente contra estos receptores. En todas las secciones, las células epiteliales teñidas para MOR (60 ± 10 frente al $5 \pm 3\%$), CB1 (60 ± 8 frente al $20 \pm 4\%$) o CB2 (40 ± 7 frente al $20 \pm 5\%$) fueron significativamente más numerosas en los ratones que recibieron la cepa de *Lactobacillus acidophilus* en comparación con los ratones control (figuras 8-13). La tinción de verde se localizó principalmente en las células epiteliales situadas en la superficie del epitelio, en contacto con las bacterias lumenales (figuras 8-13). Los controles que omitían el primer anticuerpo o el uso de un anticuerpo irrelevante fueron negativos.

45

3) La administración de *Lactobacillus acidophilus* está asociada con una disminución en la expresión de citocinas inflamatorias en el colon de ratones (figuras 5-7)

Con el fin de evaluar si la expresión inducida por *Lactobacillus acidophilus* de MOR, CB1 y CB2 por las células epiteliales de colon puede tener importancia funcional en ratones, se compararon los niveles de ARNm de diferentes citocinas inflamatorias en ratones no tratados y animales que recibieron la cepa de *Lactobacillus acidophilus* durante 14 días. Se observó una expresión disminuida en más del 50% en los niveles de ARNm de las citocinas inflamatorias TNF α , KC e IL-1 β en los animales tratados con *Lactobacillus acidophilus* en comparación con los controles, lo que sugiere que la cepa de *Lactobacillus acidophilus* reduce la expresión fisiológica de las citocinas inflamatorias en el colon de ratones a través de al menos en parte una sobreexpresión de MOR, CB1 y CB2 por las células epiteliales.

Ejemplo 3

1/Materiales y métodos

Se incubaron *in vitro* células epiteliales de colon HT-29 o Caco-2 durante de 0 a 6 horas con diferentes probióticos o bacterias (100 bacterias/célula): *L. acidophilus* (NCFM), *L. salivarius* (UCC118), *L. paracasei* (LPC37), *E. coli* comensal, *E. coli* adherente e invasiva (LF82). Se sometió a prueba el papel de la ruta de NF kappa B en la inducción de la expresión del receptor mu opioide (MOR) y de los receptores cannabinoides (CB1 y CB2) por los probióticos pretratando las células HT-29 mediante un inhibidor específico, el éster fenílico del ácido caféico (CAPE). Se usó el TNF alfa (10 ng/ml, 2 horas), que es un inductor de la expresión de proteínas G acopladas, como control positivo. Tras la selección del probiótico más eficaz para inducir la expresión *in vitro* de los receptores (receptores MOR, CB1 y CB2), se realizó un estudio *in vivo* con ratones Balb/c (n=10) mediante la administración oral de 10⁹ UFC de probióticos durante 15 días. Se evaluó la expresión de MOR, CB1 y CB2 en las células epiteliales y en el colon de ratones mediante PCR en tiempo real y mediante inmunohistoquímica. Se sometió a ensayo el ARNm de las citocinas inflamatorias (TNF alfa, KC e IL-1 beta) mediante PCR en tiempo real en el colon de los ratones.

2/ Resultados

Sólo las cepas de *L. acidophilus* y *L. salivarius* pudieron inducir rápidamente, casi desde la primera hora de incubación, una fuerte expresión de MOR en las células epiteliales. Esta inducción de la expresión fue similar a la inducción de la expresión observada con las células inducidas por TNF alfa. Para CB1 (848 $\pm$ 180 frente a 229 $\pm$ 55, p<0,05) y CB2 (1498 $\pm$ 333 frente a 341 $\pm$ 163, p<0,01), sólo *L. Acidophilus* indujo la expresión de estos receptores. La inhibición de la ruta de NF kappa B por CAPE no indujo modificaciones de la expresión de MOR por las células epiteliales estimuladas con *L. acidophilus*. *In vivo*, la administración de *L. acidophilus* indujo fuertemente la expresión del ARNm de MOR (24 $\pm$ 0,75, p<0,01) a nivel del colon. El estudio mediante inmunohistoquímica confirmó la inducción *in vivo* de la expresión de MOR, CB1 y CB2 por las células de colon en animales que recibieron *L. acidophilus*. La inducción de estos receptores está asociada con una disminución de al menos el 50% de la expresión de citocinas inflamatorias de colon.

3/ Conclusión

L. acidophilus es la cepa más eficaz para inducir la expresión de MOR, CB1 y CB2 en líneas de células epiteliales *in vitro* e *in vivo* en el colon.

Lista de secuencias

- <110> DANISCO A/S
- 5 <120> Cepa de *Lactobacillus acidophilus* que tiene propiedades analgésicas en el sistema gastrointestinal
- <130> BCT050283
<150> FR0409966
- 10 <151> 21-09-2004
- <160> 22
- <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial
- 20 <220>
<223> oligonucleótido como cebador
- <400> 1
25 atgccagtgc tcatcattac 20
- <210> 2
<211> 23
<212> ADN
30 <213> artificial
- <220>
<223> oligonucleótido como cebador
- 35 <400> 2
gatccttcga agattcctgt cct 23
- <210> 3
<211> 25
40 <212> ADN
<213> artificial
- <220>
<223> oligonucleótido como cebador
- 45 <400> 3
tcacccacac tgtgcccatc tacga 25
- <210> 4
50 <211> 24
<212> ADN
<213> artificial
- <220>
55 <223> oligonucleótido como cebador
- <400> 4
cagcggaacc gtcattgcc aatg 24
- 60 <210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

<220>
 <223> oligonucleótido como cebador

 <400> 5
 5 **cctagatggc ctgcagata cc** 22

 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador

 <400> 6
 15 **tgtcatttga gcccaagtac ag** 22

 <210> 7
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 25
 <400> 7
 gctaagtgcc ctggagaacg t 21

 <210> 8
 30 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido como cebador

 <400> 8
 tcagccccag ccaagct 17

 40 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador

 <400> 9
 50 **gggtcagaag gattcctatg** 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador

 <400> 10
 60 **gggtctcaaac atgatctggg** 20

 <210> 11
 <211> 15
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 5
 <400> 11
 cggcagccc ttcca 15
 <210> 12
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> oligonucleótido como cebador
 <400> 12
 gaggcccact acacacacga t 21
 <210> 13
 20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido como cebador
 <400> 13
 gcccgcatgg acattagg 18
 30 <210> 14
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 <400> 14
 40 agggccccag cagatga 17
 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 50 <400> 15
 ctcaatttt ctggtcccta tg 22
 <210> 16
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 60 <400> 16
 agtctggcac cgctaaacaa g 21

<210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 <400> 17
 tgggagtaga caaggtacaa ccc 23
 10
 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 20
 <400> 18
 catctttctc aaaattogag tgacaa 26
 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 30
 <400> 19
 gatccacact ctccagctgc a 21
 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 40
 <400> 20
 caaccaacaa gtgatattct ccatg 25
 45
 <210> 21
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador
 <400> 21
 ggcgcctatc gccaatg 17
 55
 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 60
 <220>
 <223> oligonucleótido como cebador

<400> 22

ctggatgttc ttgagtgaa tcc 23

REIVINDICACIONES

1. *Lactobacillus acidophilus* para su uso en el tratamiento analgésico del sistema gastrointestinal de seres humanos o animales, caracterizado porque no estando dicho *Lactobacillus acidophilus* en forma de una mezcla con bacterias lácticas.
2. *Lactobacillus acidophilus* para su uso en el tratamiento analgésico del sistema gastrointestinal de seres humanos o animales, caracterizado porque dicho *Lactobacillus acidophilus* el único principio activo.
3. *Lactobacillus acidophilus* para su uso en el tratamiento analgésico del sistema gastrointestinal de seres humanos o animales según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque induce dicho *Lactobacillus acidophilus* la expresión del receptor opioide μ (MOR) y de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en células epiteliales de colon.
4. *Lactobacillus acidophilus* para su uso en el tratamiento analgésico del sistema gastrointestinal de seres humanos o animales, caracterizado porque dicho *Lactobacillus acidophilus* la cepa registrada en la ATCC con el número PTA-4797 y también conocida como *Lactobacillus acidophilus* NCFM.
5. Procedimiento *in vitro* para seleccionar un microorganismo para preparar un soporte administrado a seres humanos o animales para un fin analgésico en el sistema gastrointestinal caracterizado porque comprende las siguientes fases:
 - i) llevar el microorganismo que va a someterse a prueba en contacto con al menos una célula epitelial;
 - ii) detectar la expresión de los receptores opioides y/o receptores cannabinoides en al menos una célula epitelial;en el que el microorganismo que va a someterse a prueba se selecciona si induce la expresión del receptor opioide μ (MOR) y de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque al menos una célula epitelial de la fase i) o ii) procede de la línea celular ATCC HTB-38 o de la línea celular Caco-2.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 6, caracterizado porque la fase ii) se lleva a cabo mediante la detección de los receptores μ para opioides y los receptores CB1 y los receptores CB2.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque la fase ii) se lleva a cabo mediante la detección de la expresión del ARN mensajero de los receptores opioides y de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

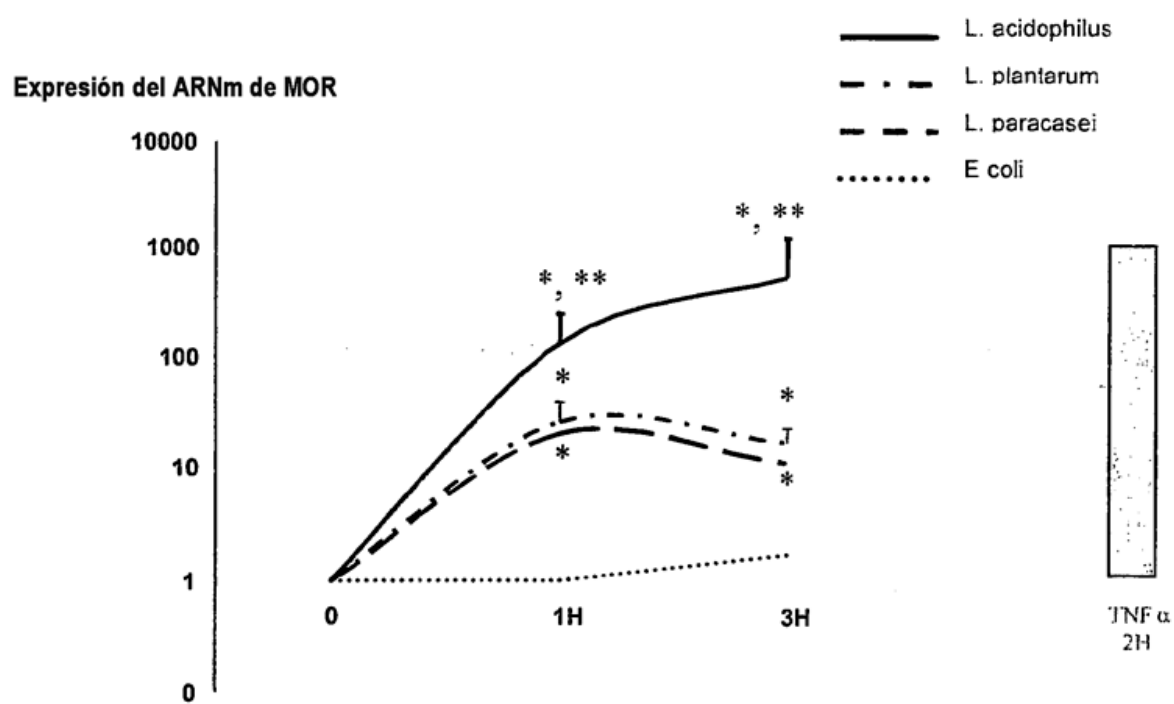


Figura 1

Expresión del ARNm del receptor CB1

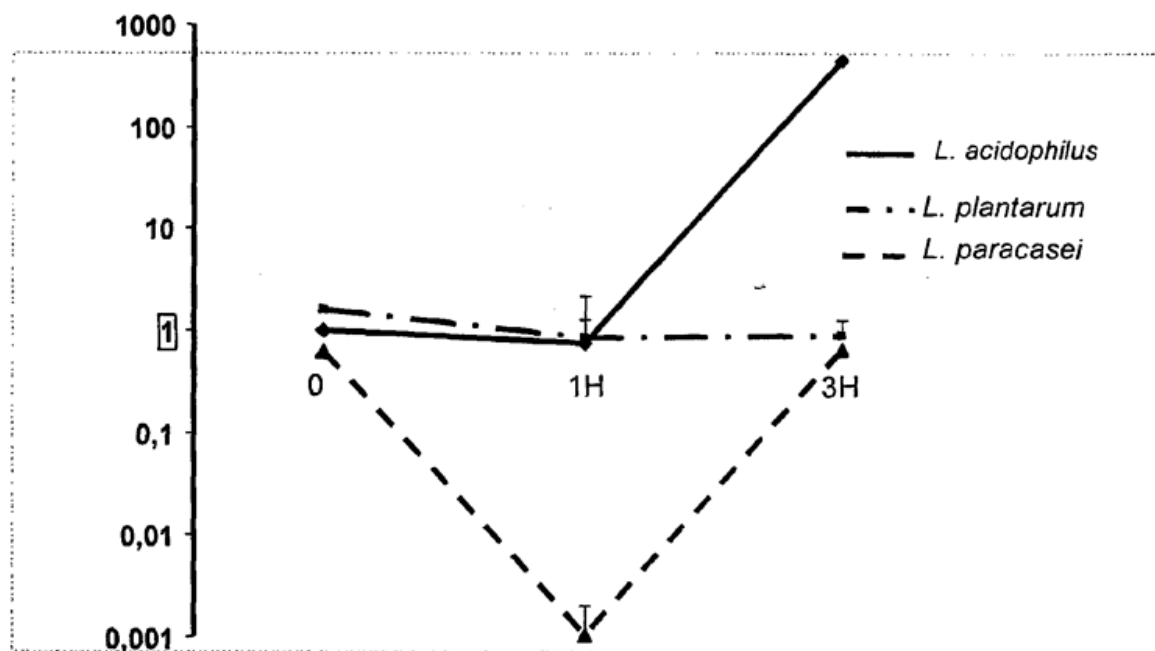


Figura 2

Expresión del ARNm de CB2

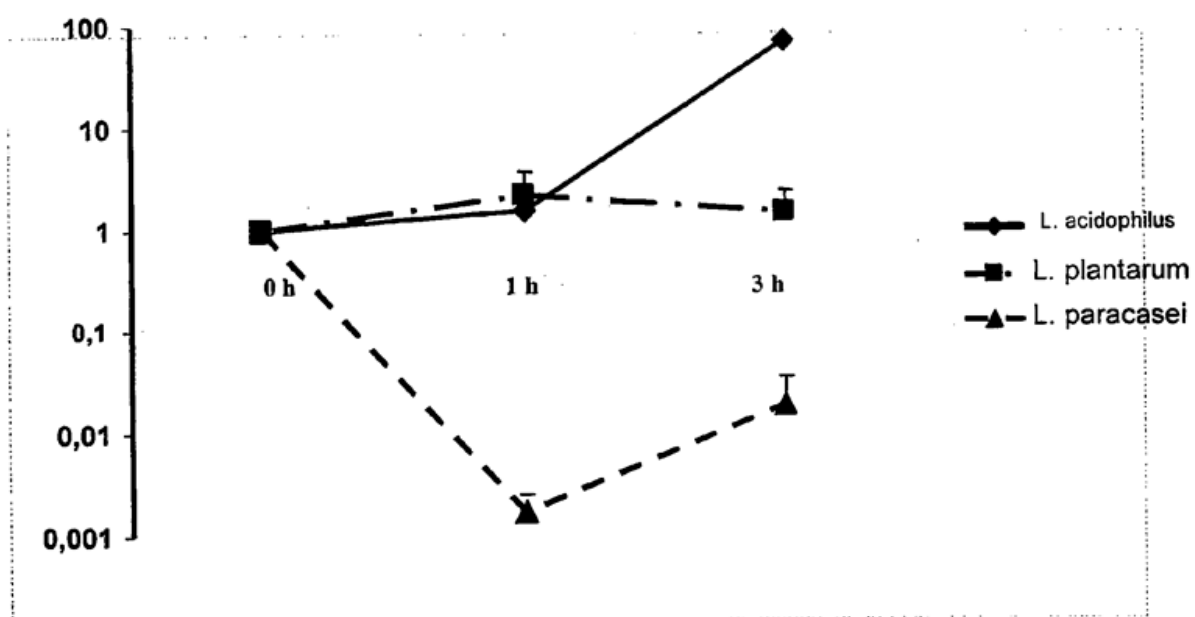


Figura 3

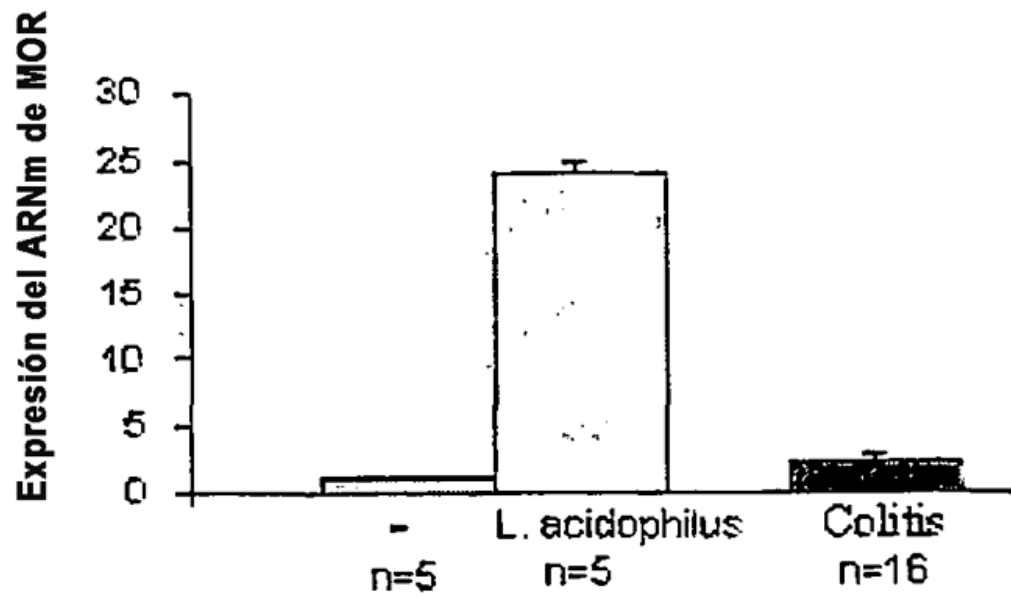


Figura 4

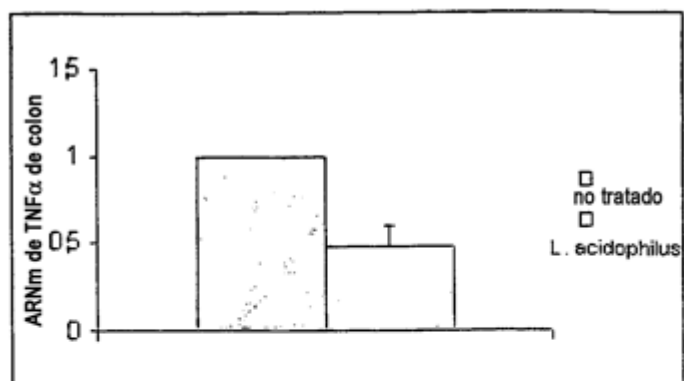


Figura 5

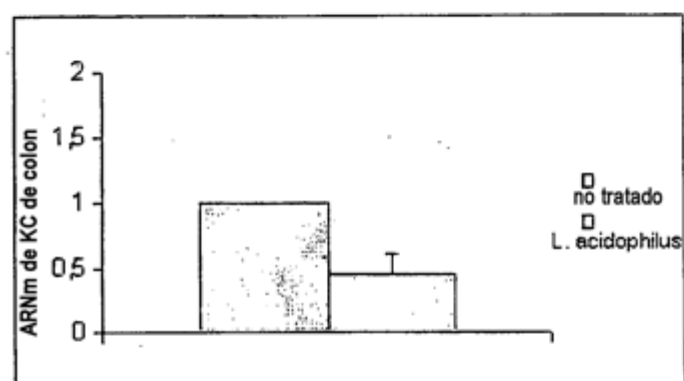


Figura 6

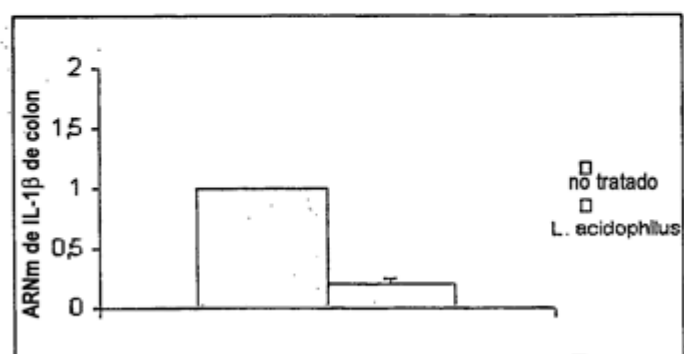


Figura 7

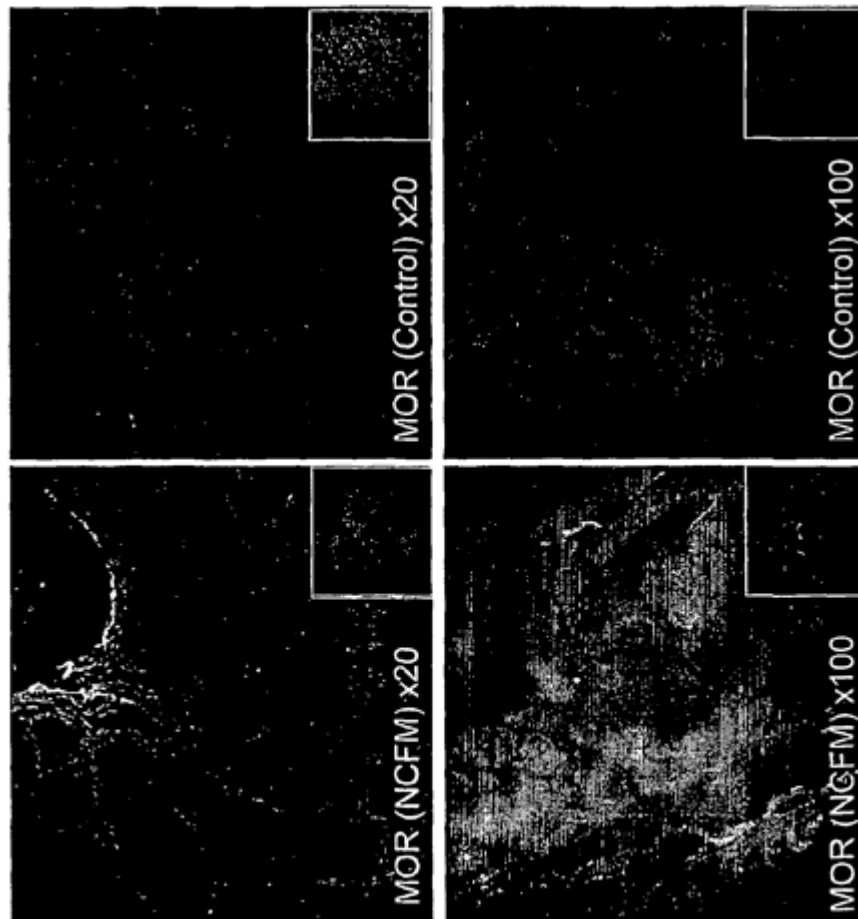


Figura 8

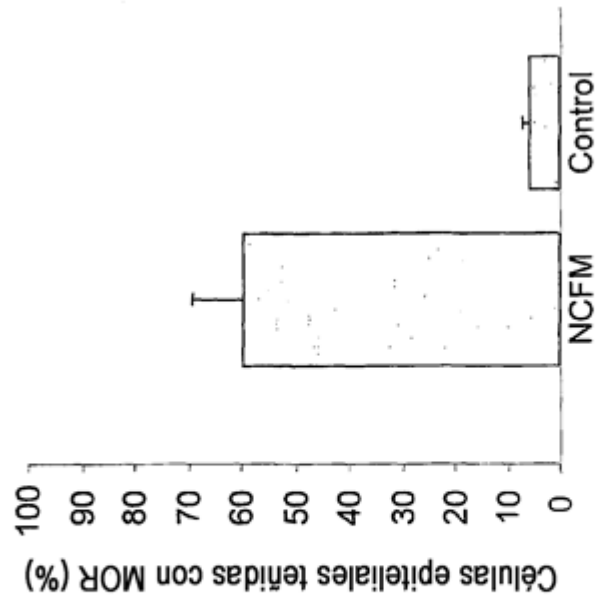


Figura 9

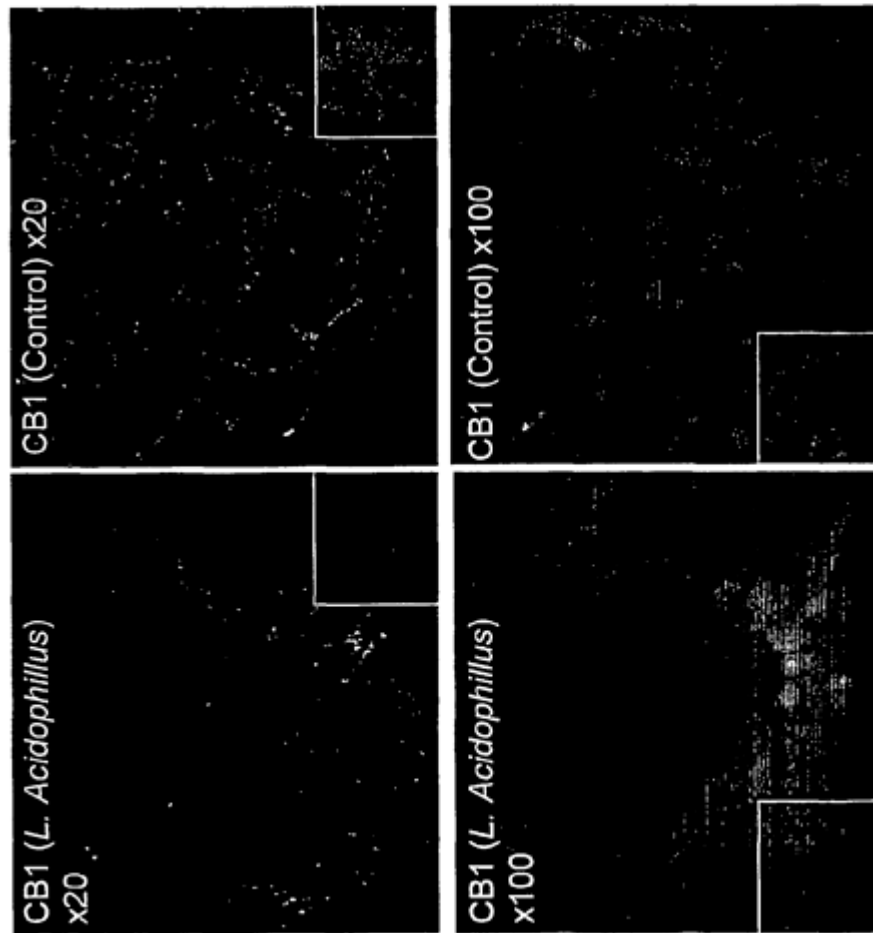


Figura 10

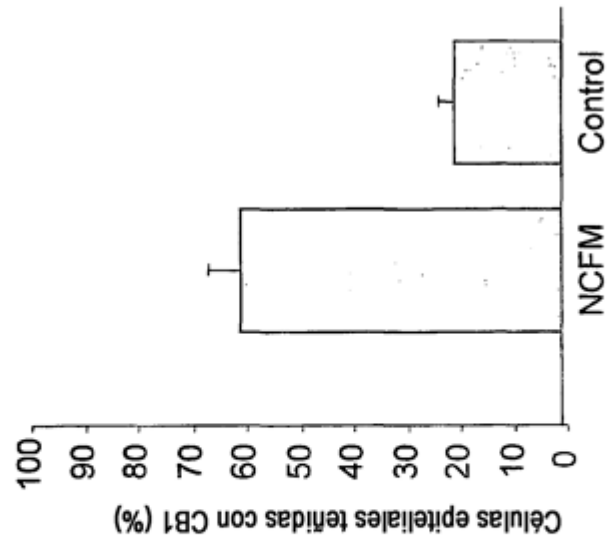


Figura 11

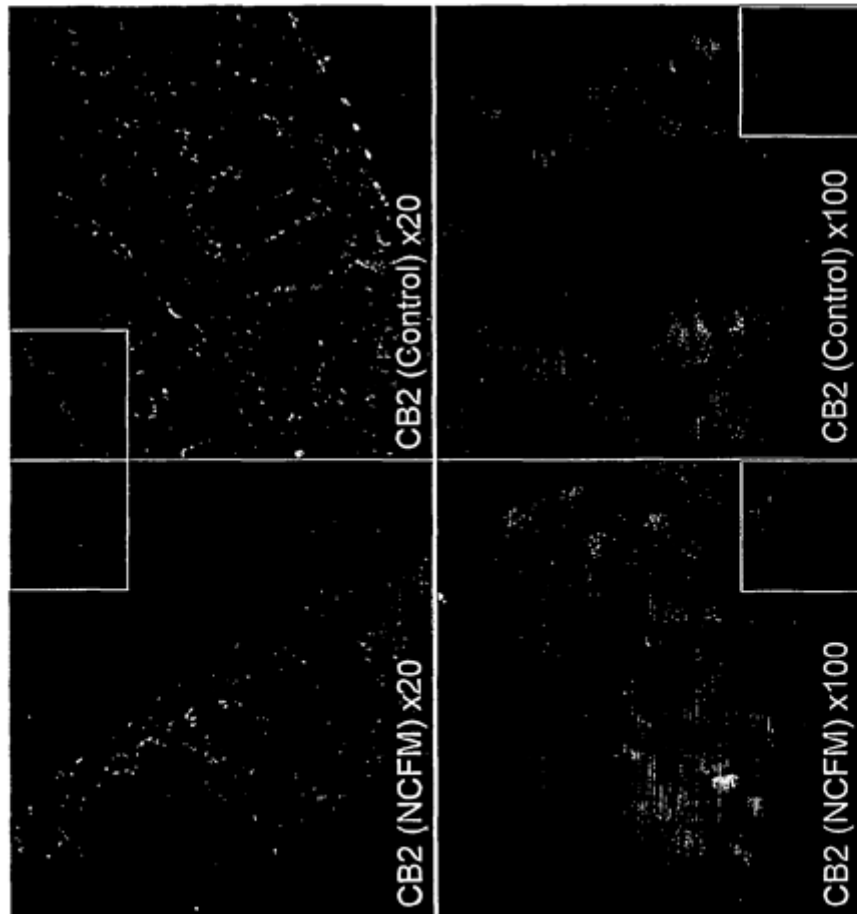


Figura 12

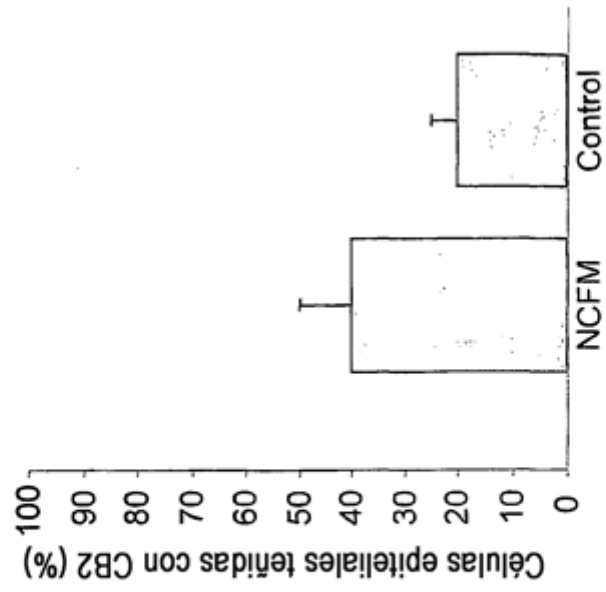


Figura 13