

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 848**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2004 E 04749582 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1608965**

54 Título: **Métodos de determinación de la eficacia de los tratamientos de enfermedades inflamatorias del colon**

30 Prioridad:

**01.04.2003 US 404512**

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

**23.12.2013**

73 Titular/es:

**THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (50.0%)  
One Procter & Gamble Plaza  
Cincinnati, OH 45202, US y  
ALIMENTARY HEALTH LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHEN, KER-SANG;  
COLLINS, JOHN KEVIN;  
KIELY, BARRY PIUS;  
LUO, FANGI;  
O'MAHONY, LIAM DIARMUID;  
PHILLIPSON, ROSS, PETER y  
SHANAHAN, FERGUS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 435 848 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

Métodos de determinación de la eficacia de los tratamientos de enfermedades inflamatorias del colon

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo de las enfermedades inflamatorias del colon, especialmente a métodos de selección y de determinación de la eficacia de los tratamientos de estas enfermedades.

### Antecedentes

10 Enfermedades inflamatorias del colon es el término general utilizado para las enfermedades que ocasionan inflamación del intestino como, por ejemplo, el síndrome del intestino irritable (SII), y las enfermedades inflamatorias del colon (EII) tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, que son trastornos inflamatorios crónicos del tracto gastrointestinal (GI). La colitis ulcerosa, por ejemplo, es una enfermedad inflamatoria intestinal que ocasiona inflamación de la mucosa que recubre el intestino grueso y que se produce, generalmente, en el recto y en la parte inferior del colon, pero que afecta al colon entero. La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier zona del tracto gastrointestinal (es decir, a la boca, al esófago, al estómago, al intestino delgado, al intestino grueso, al recto y al ano), y puede afectar a todas las capas de la pared intestinal. La causa de muchas de estas enfermedades es desconocida.

15 El síndrome del intestino irritable es un trastorno funcional del tracto gastrointestinal en el que se producen molestias o dolor abdominal asociados con la defecación o con cambios en el movimiento intestinal, y que presenta signos de trastornos en los patrones de deposición. Estos síntomas suponen una condición en la que las irregularidades en la función motora y/o sensorial del intestino pueden estar asociadas con trastornos psicosociales, y la interacción da lugar a síntomas del tracto gastrointestinal de diferente intensidad.

20 El síndrome del intestino irritable se considera hoy en día el trastorno gastrointestinal más habitual. Se estima que, en occidente, la tasa de prevalencia es de 15%-20% de la población adolescente y adulta, y el trastorno representa el 20%-50% de las consultas en clínicas gastroenterológicas.

25 Los métodos empleados para el síndrome del intestino irritable consisten en la identificación de los síntomas característicos del síndrome y en excluir las enfermedades orgánicas con manifestaciones similares, seguido de terapias farmacológicas y no farmacológicas, según resulte apropiado. Las opciones terapéuticas farmacológicas actuales son limitadas y la eficacia de muchas de dichas opciones está escasamente documentada. Las terapias farmacológicas habituales van encaminadas a tratar los síntomas, siendo el objetivo modular la motilidad intestinal, disminuir la hipersensibilidad del vientre o tratar los trastornos asociados, especialmente la ansiedad o la depresión.

30 Los síntomas más habituales de la enfermedad inflamatoria intestinal incluyen dolor abdominal, tenesmo, urgencia fecal y diarrea sanguinolenta. Las personas que la padecen pueden también experimentar fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, sangrado rectal y pérdida de fluidos corporales y de electrolitos. Los síntomas de la enfermedad son generalmente progresivos y las personas que la padecen experimentan, de forma típica, períodos de remisión seguidos de severas recaídas.

35 A pesar de la prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal (se estima que, solo en Estados Unidos, afecta a 2 millones de personas), no existe cura y todavía no se conocen las causas exactas de la enfermedad. Los tratamientos convencionales de la enfermedad inflamatoria intestinal utilizados hasta la fecha incluyen medicamentos antiinflamatorios, medicamentos inmunosupresores y tratamientos quirúrgicos. Sin embargo, muchos de los medicamentos usados para tratar la enfermedad tienen efectos secundarios negativos tales como náuseas, mareo, anemia, leucopenia, erupciones cutáneas y adicción a los medicamentos, y los procedimientos quirúrgicos son, a menudo, procedimientos radicales tales como la resección intestinal y la colectomía.

40 Por este motivo, diversos investigadores han intentado identificar medicamentos nuevos y novedosos para tratar las enfermedades inflamatorias del colon. Desgraciadamente, la propia naturaleza de la enfermedad hace que sea muy difícil llevar a cabo una selección y determinación de la eficacia de los posibles tratamientos en pacientes humanos. A menudo, esto hace que los ensayos en humanos dependan del testimonio subjetivo de los propios candidatos, con pocos o en ausencia de datos bioquímicos o fisiológicos que avalen las reivindicaciones. Pueden usarse modelos animales para poder tomar secciones de tejido de los órganos afectados, pero las drogas que son eficaces en modelos animales no siempre tienen la misma eficacia en los humanos.

45 El control de las enfermedades inflamatorias del colon se lleva a cabo a diferentes niveles. Los factores de control incluyen hormonas, prostaglandinas, productos intermedios con oxígeno y nitrógeno reactivo, leucotrienos y citoquinas. Las citoquinas son proteínas biológicamente activas de bajo peso molecular involucradas en la generación y en el control de las respuestas inmunológicas e inflamatorias. Las citoquinas son producidas por diversos tipos de célula, siendo los neutrófilos, los monocitos y los linfocitos las fuentes principales durante las reacciones inflamatorias debido a su mayor número en la zona lesionada.

Existen mecanismos múltiples por los cuales las citoquinas generadas en las zonas de inflamación afectan a la respuesta inflamatoria. La quimotaxis estimula el anidamiento de las células inflamatorias en la zona lesionada, mientras que determinadas citoquinas favorecen la infiltración de las células en el tejido. Las citoquinas liberadas en el tejido lesionado dan lugar a la activación del infiltrado inflamatorio. La mayoría de las citoquinas son pleiotrópicas y expresan múltiples actividades que se solapan desde el punto de vista biológico. Las cascadas y redes de citoquina controlan la respuesta inflamatoria y no la acción de una citoquina en concreto en un tipo celular en concreto. Puesto que las respuestas inflamatorias incontroladas pueden ocasionar enfermedades tales como enfermedades inflamatorias del colon, es razonable suponer que la producción de citoquinas está alterada en los individuos que padecen dichas enfermedades. Sin embargo, puesto que muchas citoquinas pueden tener actividades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, es muy difícil atribuir síntomas de la enfermedad, o de recuperación, a partir de una citoquina determinada.

Teniendo en cuenta lo anterior, es deseable proporcionar métodos de selección y de medida de la eficacia de los posibles tratamientos de las enfermedades inflamatorias del colon en los humanos o en otros mamíferos que generen datos bioquímicos y fisiológicos. Estos datos podrían usarse para evaluar la eficacia del tratamiento. Es deseable además proporcionar métodos para medir los cambios en los niveles de citoquinas específicas potencialmente involucradas en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias del colon que permitan hacer un seguimiento constante del pronóstico y del avance de la enfermedad en un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal.

### Sumario

La presente invención proporciona un método *in vitro* de selección de composiciones probióticas según su eficacia en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias del colon que comprende las etapas de:

- a) tratar una muestra biológica que comprende al menos un tipo celular intestinal con la composición probiótica *in vitro*;
- b) medir el nivel de, al menos, una citoquina antiinflamatoria y, al menos, una citoquina proinflamatoria en la muestra biológica después del tratamiento con la composición probiótica;
- c) determinar la relación de, al menos, una citoquina antiinflamatoria a, al menos, una citoquina proinflamatoria en la muestra biológica después del tratamiento con la composición probiótica;

caracterizado por que una relación determinada según la etapa (c) de la muestra biológica tratada superior a la misma relación determinada en una muestra biológica de control sin tratar sometida a ensayo al mismo tiempo indica que la composición probiótica inhibe las enfermedades inflamatorias del colon, y una relación determinada según (c) igual o inferior a la relación de la muestra biológica de control no tratada indica que la composición probiótica no inhibe las enfermedades inflamatorias del colon;

en el que dicha relación de citoquina antiinflamatoria a citoquina proinflamatoria es la relación interleucina-10/interleucina-12.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un gráfico de barras que muestra la relación media de IL-10 a IL-12 generada a partir de PBMC correspondientes a pacientes con síndrome del intestino irritable con estimulación *in vitro* antes y después de suministrar *Bifidobacteria infantis*.

La Fig. 2 es un gráfico de barras que muestra la relación media de IL-10 a TNF- $\alpha$  generada a partir de PBMC correspondientes a pacientes con síndrome del intestino irritable con estimulación *in vitro* antes y después de suministrar *Bifidobacteria infantis*.

La Fig. 3 es un gráfico de barras que muestra la relación media de IL-10 a IFN- $\gamma$  generada a partir de PBMC correspondientes a pacientes con síndrome del intestino irritable con estimulación *in vitro* antes y después de suministrar *Bifidobacteria infantis*.

La Tabla 1 muestra los coeficientes de correlación de Pearson y los valores *p* para evaluar la significación estadística de la asociación negativa entre el cambio de la relación IL-10 a IL-12 y el cambio en la puntuación de dolor/molestia abdominal en pacientes con síndrome del intestino irritable a los que se les había suministrado *Bifidobacterium infantis*. Obsérvese que la relación media de IL-10 a IL-12 aumentó y que la puntuación media dolor/molestia abdominal disminuyó antes y después de suministrar *Bifidobacterium infantis*.

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra la relación de citoquinas antiinflamatorias a citoquinas proinflamatorias producidas por las células del nodo linfático mesentérico (MLNC) estimuladas *in vitro*.

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra la relación de citoquinas antiinflamatorias a citoquinas proinflamatorias producidas por las células de la placa de Peyer (PP) estimuladas *in vitro*.

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra la relación de citoquinas antiinflamatorias a citoquinas proinflamatorias producidas por las células dendríticas derivadas de células del nodo linfático mesentérico (MLNC DC) estimuladas *in vitro*.

#### Descripción detallada

5 Todos los pesos, medidas y concentraciones en la presente memoria se miden a 25 °C en la totalidad de la composición, salvo que se indique lo contrario.

Salvo que se indique lo contrario, todos los porcentajes de composiciones referidas en la presente memoria son porcentajes en peso y todas las relaciones son relaciones en peso.

Salvo que se indique lo contrario, todos los pesos moleculares son pesos moleculares promedios en peso.

10 Excepto en los casos en los que se detallan los valores de medición reales de ejemplos específicos, los valores numéricos a los que se hace referencia en la presente memoria deberán considerarse acompañados por la palabra “aproximadamente”.

En la presente memoria, “enfermedades inflamatorias del colon” incluye “síndrome del intestino irritable (SII)” y “enfermedad inflamatoria intestinal (EII)”.

15 En la presente memoria, “enfermedad inflamatoria intestinal” o “EII” incluye enfermedades que causan inflamación de los intestinos tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

#### Métodos y uso

La presente invención va dirigida a proporcionar un método *in vitro* de selección de composiciones probióticas según su eficacia en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias del colon que comprende las etapas de:

- 20 a) tratar una muestra biológica que comprende, al menos, un tipo celular intestinal con la composición probiótica *in vitro*;
- b) medir el nivel de, al menos, una citoquina antiinflamatoria y, al menos, una citoquina proinflamatoria en la muestra biológica después del tratamiento con la composición probiótica;
- 25 c) determinar la relación de, al menos, una citoquina antiinflamatoria a, al menos, una citoquina proinflamatoria en la muestra biológica después del tratamiento con la composición probiótica;

30 caracterizado por que una relación determinada según la etapa (c) de la muestra biológica tratada superior a la misma relación determinada en una muestra biológica de control sin tratar sometida a ensayo al mismo tiempo indica que la composición probiótica inhibe las enfermedades inflamatorias del colon, y una relación determinada según (c) igual o inferior a la relación de la muestra biológica de control no tratada indica que la composición probiótica no inhibe las enfermedades inflamatorias del colon;

en el que dicha relación de citoquina antiinflamatoria a citoquina proinflamatoria es la relación interleucina-10/interleucina-12.

35 Los métodos de la presente invención son adecuados para usar en la selección y en la determinación de la eficacia clínica de los tratamientos y composiciones para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias del colon. Estas enfermedades incluyen trastornos gastrointestinales inflamatorios, siendo algunos ejemplos no limitativos el síndrome del intestino irritable (SII) y enfermedades inflamatoria intestinal tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Preferiblemente, el método de la presente invención se utiliza para determinar la eficacia de los tratamientos del síndrome del intestino irritable (IBS).

40 Los tratamientos de la presente invención incluyen cualquier tratamiento y/o composición para usar en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias del colon. Las composiciones pueden comprender uno o más ingredientes que tengan eficacia potencial en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del colon, preferiblemente síndrome del intestino irritable. Las composiciones son composiciones probióticas.

#### Muestra biológica para el método *in vitro*

45 El método *in vitro* de la presente invención utiliza una muestra biológica que comprende, al menos, un tipo celular intestinal. Se ha descubierto que el uso del tipo celular intestinal en el método *in vitro* es ventajoso frente a los métodos *in vitro* del estado de la técnica en los que se emplean otros tejidos como, por ejemplo, mononucleocitos de sangre periférica. Sin pretender imponer ninguna teoría, se piensa que esto es debido a que la interacción entre la composición para tratar las enfermedades inflamatorias del colon objeto de estudio y el intestino es más indicativa de lo que está sucediendo *in vivo*. Se ha descubierto que el método de selección *in vitro* de la presente invención

50 identifica con mayor facilidad posibles tratamientos de las enfermedades inflamatorias del colon y tiene una mejor correlación con la eficacia clínica. Sin pretender imponer ninguna teoría, se piensa que esto es debido al hecho de

que en las enfermedades inflamatorias del colon, el tejido del intestino desempeña un papel principal en la mediación de la respuesta inflamatoria y a que, por lo tanto, es más probable que estas composiciones que alteran de forma ventajosa la relación de citoquina de los tipos celulares intestinales *in vitro* tengan un efecto *in vivo*.

5 En la presente memoria, “tipo celular intestinal” incluye tipos celulares y cepas que tienen su origen en el intestino o en tejido asociado con el intestino de un mamífero, incluyendo dicho tejido el estómago, el duodeno, el yeyuno, el ileon, el tejido linfóide, el tejido mesentérico, el tejido axilar, el tejido inguinal, el tejido popliteal, el tejido mieloide, el ciego, el colon, el apéndice y el recto. Además, dichos tipos de células también incluyen células recién aisladas de dichos tejidos, y tipos de células obtenidas de cultivos *in vitro* de rutina seguidos de aislamiento de los tejidos anteriores, incluidas las líneas celulares no inmortalizadas, líneas celulares carcinógenas y líneas celulares  
10 inmortalizadas no cancerosas. Preferiblemente, el método *in vitro* utiliza una muestra biológica que comprende tejidos linfoides asociados con el intestino recién aislados, o cultivos celulares *in vitro* de los mismos. Más preferiblemente, la muestra biológica comprende células del nodo linfático mesentérico recién aisladas, o cultivos celulares *in vitro* de las mismas.

15 Además, el método *in vitro* de la presente invención puede, de forma adicional, comprender la etapa adicional de estimular la muestra biológica antes de la etapa (c) anterior. En la presente memoria “estimulación *in vitro*” incluye la estimulación de muestras biológicas fuera del cuerpo del donante, de forma típica en un ajuste de cultivo de tejidos en laboratorio. Preferiblemente, el estímulo comprende un mitógeno, un probiótico, moléculas anti CD3 conocidas por el experto en la técnica, y mezclas de los mismos. Más preferiblemente, el estímulo comprende un mitógeno, un probiótico, y mezclas de los mismos.

20 En la presente memoria, “mitógeno” incluye materiales que son capaces de inducir división celular en un porcentaje elevado de células T ó B. Ejemplos de mitógenos adecuados útiles en la presente memoria incluyen lectinas, lipopolisacáridos bacterianos, superantígenos y mezclas de los mismos. En la presente memoria, “superantígeno” incluye materiales que pueden unirse a los restos en el dominio V (variable) del receptor de células T y a los restos en las moléculas MHC de clase II fuera de la hendidura de unión al antígeno, incluso si el receptor de la célula T no reconoce el péptido del antígeno unido a la molécula MHC de clase II. Ejemplos adecuados de superantígenos útiles  
25 en la presente memoria incluyen enterotoxinas de estafilococos, toxina 1 del síndrome del shock tóxico, y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el mitógeno comprende lectinas, lipopolisacáridos bacterianos, y mezclas de los mismos. Entre los ejemplos adecuados de lectinas útiles en la presente invención se incluyen concanavalina A (aislada de judías canavalia), fitohemaglutinina (aislada de las judías rojas), mitógeno de *Phytolacca* (aislado de plantas del género *Phytolacca*) y mezclas de los mismos, preferiblemente fitohemaglutinina (PHA). Ejemplos adecuados de lipopolisacáridos bacterianos útiles en la presente invención incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*)  
30 0111:B4, *E. coli* 055:B5, *E. coli* K-235 (comercializados todos por Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.)), *Salmonella Minnesota*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, y mezclas de los mismos.

35 Los probióticos son microorganismos, o composiciones procesadas de microorganismos, que afectan de forma ventajosa a un hospedador. Se desconoce de qué modo los probióticos afectan de forma ventajosa al hospedador. A los efectos de la presente invención, se prevé que el término “probióticos” también incluya los metabolitos generados por los microorganismos durante un proceso de fermentación, si no son citados por separado. Estos metabolitos se pueden liberar al medio de fermentación, o bien pueden quedar almacenados dentro del microorganismo. Tal como se utiliza en la presente memoria, “probióticos” también incluye las bacterias, homogeneizados de bacterias, proteínas bacterianas, extractos bacterianos, sobrenadantes bacterianos, y mezclas de los mismos, que cumplen funciones beneficiosas para el hospedador cuando se administran a dosis terapéuticas. Por lo tanto, pueden incluirse levaduras, mohos y bacterias. En EP-0862863 se enumeran algunos ejemplos de materiales probióticos conocidos en la actualidad. Los ejemplos adecuados de probióticos útiles en la presente  
40 invención comprenden cepas de *Bifidobacterium longum infantis* (NCIMB 35624) *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225), *Bifidobacterium lactis* (DSM20215), *Lactobacillus paracasei* (CNCM I-2216), y mezclas de los mismos. Otros ejemplos no limitativos de probióticos útiles en la presente invención se describen en WO 03/010297 A1, WO 03/010298 A1, WO 03/010299 A1 (publicadas todas el 6 de febrero de 2003 y concedidas a Alimentary Health Ltd).

#### Citoquinas

50 Los métodos de la presente invención comprenden la etapa de medir, al menos, un nivel antiinflamatorio y, al menos, un nivel proinflamatorio en una muestra biológica obtenida de un paciente mamífero. Es conocido por el experto en la técnica que las citoquinas son pleiotrópicas, y expresan múltiples actividades que se solapan desde el punto de vista biológico. Por tanto, debería entenderse que, aunque las citoquinas útiles en la presente invención se clasifican por su acción antiinflamatoria en el presente sistema, algunos ingredientes pueden proporcionar en  
55 algunos casos más de una respuesta inmunológica. Por lo tanto, las clasificaciones en la presente memoria se realizan por cuestiones de comodidad.

Las citoquinas antiinflamatorias comprenden las conocidas en la técnica. Entre los ejemplos no limitativos de citoquinas antiinflamatorias se incluyen la interleucina-4, la interleucina-5, la interleucina-13, la interleucina-10, el factor del crecimiento transformante- $\beta$ , y mezclas de los mismos. Las citoquinas antiinflamatorias reivindicadas en la  
60 presente invención son interleucina-10 (IL-10: número de registro: CAA55201; GI número de registro: 14625940).

Las citoquinas proinflamatorias comprenden las conocidas en la técnica. Entre los ejemplos no limitativos de citoquinas proinflamatorias se incluyen la interleucina-2, la interleucina-12 heterodimérica, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , el factor de necrosis tumoral- $\beta$ , la interferona- $\gamma$ , y mezclas de los mismos. Las citoquinas proinflamatorias reivindicadas en la presente memoria son interleucina-12 (IL-12: número de registro: cadena A; 1F45A, cadena B; 1F45B; GI número de registro ID: cadena A; 1479640; cadena B; 1479641).

#### Medios de medición de niveles

Según el método de la presente invención, se miden los niveles de, al menos, una citoquina antiinflamatoria y, al menos, una citoquina proinflamatoria en la muestra biológica. Los medios de medición de los niveles de citoquinas antiinflamatorias o proinflamatorias, o ambos, comprenden métodos conocidos por el experto en la técnica. Los niveles de dichas citoquinas antiinflamatorias y de dichas citoquinas proinflamatorias pueden medirse midiendo la expresión de mRNA o la expresión de proteínas, como es conocido por el experto en la técnica. Ejemplos no limitativos de dichos métodos incluyen análisis inmunoabsorbentes, técnicas de análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (técnicas ELISA), análisis radioinmunológicos (RIA), técnicas de ELISA múltiple en plataformas de micromatrices, técnicas ELISA múltiple usando microesferas codificadas conectadas a sistemas de detección mediante citometría de flujo, ensayos biológicos, transferencias Western, sistemas de separación mediante cromatografía, RT-PCR, PCR de transcripción inversa competitiva, transferencias Northern, matrices de gen, medición directa de m-RNA, y mezclas de los mismos, preferiblemente técnicas ELISA, técnicas de RIA, técnicas de ELISA múltiple con uso de microesferas codificadas en acoplamiento con sistemas de detección mediante citometría de flujo, sistemas de separación mediante cromatografía, transferencias Western, y mezclas de los mismos. Más preferiblemente los medios comprenden técnicas ELISA múltiples con uso de microesferas codificadas en acoplamiento con sistemas de detección mediante citometría de flujo. Las técnicas ELISA adecuadas para usar en el método de la presente invención comprenden las conocidas por el experto en la técnica, siendo ejemplos no limitativos de las mismas, por ejemplo, técnicas ELISA directas, técnicas ELISA indirectas, técnicas ELISA "sándwich" directas, técnicas ELISA "sándwich" indirectas, y mezclas de las mismas. Un ejemplo no limitativo de técnicas ELISA comerciales múltiples con uso de microesferas codificadas acopladas a sistemas de detección mediante citometría de flujo adecuadas para su uso en la presente invención es el kit de análisis LINCOplex comercializado por Linco Research Inc., Missouri, EE. UU, acoplado con BIOPLEX BEAD FLOW CYTOMETER™ de Bio Rad GmbH.

#### Relación

Los métodos de la presente invención comprenden las etapas de determinar la relación de, al menos, una citoquina antiinflamatoria a, al menos, una citoquina proinflamatoria. En el método *in vitro* se determinan los niveles de, al menos, una citoquina antiinflamatoria a, al menos, una citoquina proinflamatoria en la muestra de tratamiento, y en una muestra biológica de control sin tratar analizada al mismo tiempo. La muestra biológica de control debe ser derivada de la misma muestra biológica que la utilizada para el grupo de tratamiento, y debe utilizarse como un control no tratado usando los métodos y principios conocidos por el experto en la técnica. En la presente memoria, la relación de citoquina antiinflamatoria a citoquina proinflamatoria significa el nivel de citoquina antiinflamatoria dividido por el nivel de citoquina proinflamatoria. Dicha relación puede describirse mediante la fórmula:

$$\text{Relación} = \frac{\text{Nivel de citoquina antiinflamatoria}}{\text{Nivel de citoquina proinflamatoria}}$$

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que, según la presente invención, si la relación determinada según se indica en presente memoria aumenta en comparación con la relación de la muestra biológica de control sin tratar, el tratamiento puede considerarse inhibidor de las enfermedades inflamatorias del colon. La relación reivindicada es IL-10/IL-12. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que las relaciones específicas descritas en la presente memoria son decisivas para el avance o remisión de las enfermedades inflamatorias del colon y, por lo tanto, las alteraciones en las relaciones de la presente memoria son indicativas de la inhibición o contribución a los efectos de la enfermedad por parte de los tratamientos investigados. Parece que los individuos con enfermedades inflamatorias del colon tienen un perfil de citoquina sesgado indicativo de un trastorno inflamatorio. De modo similar, las citoquinas usadas en la presente memoria que muestran el mayor cambio después del tratamiento con los inhibidores de las enfermedades inflamatorias del colon indican que los pacientes que padecen dichas enfermedades tienen PBMC que muestran desviaciones hacia una mayor actividad de Th-1, alterando el equilibrio normal de citoquinas Th-1/Th-2. Se ha descubierto de forma sorprendente que aumentando las relaciones descritas en la presente memoria pueden aliviarse los síntomas de las enfermedades inflamatorias del colon. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que esto es debido al hecho de que aumentando estas relaciones en los pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del colon, el tratamiento hace que las relaciones vuelvan a los niveles encontrados en pacientes sanos, o a valores próximos.

El suministro diario oral de alimento con probiótico *Bifidobacterium infantis* 35624 durante 3 semanas aumentó la relación IL-10/IL-12 de  $11,2 \pm 3,9$  (media  $\pm$  error estándar) a  $409,5 \pm 95,2$  en PBMC de pacientes con síndrome del intestino irritable con estimulación *in vitro* mediante *Bifidobacterium infantis* 35624. De modo similar, cuando las

PBMC de la población con síndrome del intestino irritable se estimularon *in vitro* con otros probióticos, incluidos *Lactobacillus* 299V y *Lactobacillus* GG, se observaron aumentos similares en la relación IL-10/IL-12 (ver Figura 1).

De forma adicional, la estimulación probiótica (*Bifidobacterium*) de las PBMC de pacientes con síndrome del intestino irritable tras la alimentación mostró un aumento de  $0,1 \pm 0,0$  a  $2,0 \pm 0,5$  en la relación IL-10/TNF- $\alpha$  También se observaron resultados similares con otros probióticos, incluidos *Lactobacillus* 4331 y *Lactobacillus* 299V (ver Figura 2). La estimulación con probiótico *Bifidobacterium infantis* 35624 también dio lugar a un aumento en la relación IL-10/IFN- $\gamma$  de  $0,7 \pm 0,1$  a  $14,1 \pm 2,3$  después del tratamiento (ver Figura 3).

Además, se observó que el promedio de dolor/molestias abdominales disminuyó y que la relación promedio de IL-10 a IL-12 aumentó en los pacientes con síndrome del intestino irritable que fueron tratados con *Bifidobacterium infantis*. La correlación negativa entre el cambio en el dolor/molestia abdominal y el cambio en la relación de IL-10 a IL-12 indicaba que el aumento en la relación de IL-10 a IL-12 estaba asociado con el alivio del síntoma de dolor/molestia abdominal relacionado con el síndrome del intestino irritable (ver Tabla 1).

#### Metodología in vitro

Este estudio fue aprobado por el comité de ética del hospital universitario de Cork. Se obtuvieron nodos de linfa mesentérica a partir de diez pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal activa (n=10: en el intervalo de edad de 19-41 (media 32,2), 3 mujeres y 7 hombres: 5 pacientes con CD; 5 pacientes con UC). A todos los pacientes se les recetó y tomaron ácido 5'-aminosalicílico. Todos los pacientes necesitaron resección quirúrgica debido al carácter progresivo de la enfermedad y a la ausencia de respuesta del tratamiento con esteroides. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (n=12). El intervalo de edad fue de 20-51 años (media 28 años). Se estudiaron cinco mujeres y siete hombres, 5 pacientes con CD; 7 pacientes con UC.

#### Aislamiento de células de nodo linfático mesentérico (MLNC)

Para este estudio se seleccionaron nodos linfáticos mesentéricos (MLN) atendiendo cuidadosamente a su localización anatómica con respecto a las áreas de inflamación en el colon. Los MLN seleccionadas drenaron directamente un área inflamada del colon. A partir de tres pacientes que formaban parte de esta población fue posible obtener segmentos de drenaje de MLN de colon inflamado y no inflamado. Se generaron suspensiones individuales de células MLN mediante extrusión suave del tejido a través de un tamiz con una luz de malla de 180  $\mu$ . Las células se lavaron y resuspendieron en DMEM (medio eagle modificado por Dulbecco) que contenía 10% de FCS (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Las células mononucleares fueron aisladas por centrifugación de densidad Ficoll-Hypaque y se resuspendieron a  $1 \times 10^6$  células/ml en medios completos - DMEM que contenía 25 mM de glucosa, 10% de FCS, 1% de aminoácidos no esenciales, 50 U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de estreptomina (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Estas células mononucleares se denominan células de nodo linfático mesentérico (MLNC).

#### Aislamiento de células dendríticas

Se aislaron DC de MLN y de sangre periférica usando procedimientos idénticos. Las células se resuspendieron a  $5 \times 10^7$  células/ml en PBS (sin  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ ) con 4% de FCS. Para un recubrimiento óptimo de DC, se añadió 1 mM de EDTA a todos los medios y las suspensiones celulares se bloquearon con anticuerpos anti CD32 (StemCell, Meylan, Francia). Se aislaron DC a partir de esta suspensión celular, siguiendo el protocolo del fabricante, utilizando un kit de aislamiento negativo de DC (StemSep™ coctel de agotamiento, StemCell, Meylan, Francia). Se resuspendieron DC en medios exentos de suero Stemspan (StemCell, Meylan, Francia) a  $1 \times 10^6$  células/ml. La viabilidad, determinada mediante exclusión del azul de tripano, fue en todos los casos de  $\geq 98\%$ . Se evaluó la pureza de los preparados de DC usando citometría de flujo. Las células que eran HLA-DR positivas y CD3/CD14/CD16/CD19/CD20/CD56 negativas se denominaron DC. Todos los anticuerpos se obtuvieron de BD Biosciences, (Oxford, Reino Unido).

#### Cepas bacterianas

Hemos indicado previamente los criterios de selección para el aislamiento de *Lactobacillus salivarius* UCC118 (*L. salivarius*) y *Bifidobacterium infantis* 35624 (*B. infantis*). *L. salivarius* y *B. infantis* se cultivaron anaeróticamente en cultivos de rutina durante 24-48 horas en medio de deMann, Rogosa y Sharpe, MRS, (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y MRS suplementado con 0,05% de cisteína (Sigma, Dublin, Irlanda), respectivamente. *Salmonella typhimurium* UK1 (*S. typhimurium*) se cultivó anaeróticamente durante 18-24 horas en caldo de soja tréptica (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Los cultivos bacterianos se cosecharon mediante centrifugación (3000 g x 15 min), se lavaron con PBS y se diluyeron posteriormente formando composiciones que comprendían densidades celulares finales de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^3$  unidades formadoras de colonias (ufc)/ ml en DMEM.

#### Tratamiento in vitro de la muestra biológica

Todas las células se inocularon en placas de cultivo de tejidos con 24 pocillos (Costar, Schiphol-Rijk, Países Bajos) a  $1 \times 10^6$  células/ml. Las MLNC se estimularon durante 72 horas con composiciones que comprendían *L. salivarius*, *B. infantis* o *S. typhimurium* a 3 concentraciones bacterianas diferentes,  $1 \times 10^7$  UFC,  $1 \times 10^5$  UFC y  $1 \times 10^3$  UFC. Puesto

5 que el tratamiento con  $1 \times 10^7$  bacterias dio lugar a una estimulación significativa de la producción de citoquina, se utilizó esta concentración bacteriana en experimentos posteriores. Las MLNC aisladas a partir de colon no inflamado se estimularon durante 72 horas con estas bacterias a  $1 \times 10^7$  ufc. Las DC derivadas de MLN se estimularon con *L. salivarius*, *B. infantis* o *S. typhimurium* durante 24 horas. Esto se llevó a cabo en presencia de muestras biológicas de control no tratadas con el fin de evaluar los niveles espontáneos de secreción de citoquinas. Las placas se incubaron en una atmósfera humedecida al 5% en CO<sub>2</sub> y a 37 °C, tras lo cual se cultivaron los sobrenadantes para someterlos a análisis de citoquina. Se midió la producción de citoquina, según las instrucciones del fabricante, usando kits de ELISA comerciales (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Las citoquinas medidas incluyeron TNF- $\alpha$ , IL-12 p40, IL-10 y TGF- $\beta$ .

10 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron usando análisis de ANOVA. Los valores se ilustraron como la media  $\pm$  media del error estándar. Se aceptaron las diferencias estadísticamente significativas en la producción de citoquina entre las células no estimuladas (control) y las células estimuladas con bacterias correspondientes a  $p < 0,05$ .

*Resultados*

15 Como puede verse a partir de las Figuras 4, 5 y 6, la relación de citoquinas antiinflamatorias a citoquinas proinflamatorias producidas por tipos celulares intestinales *in vitro* con estimulación posterior con bacterias probióticas (Bif. 35624 y Lb. 118) es mayor que la misma relación producida por muestras de control no estimuladas. Esta tendencia, si bien no siempre alcanza significación estadística, es indicativa de la diferente interacción que las composiciones probióticas, y las composiciones en general que pueden ser beneficiosas en el  
 20 tratamiento de las enfermedades inflamatorias del colon, crean en los tejidos intestinales *in vivo* en comparación con las bacterias patógenas. Se cree que esto es indicativo de que la composición es inhibidora de las enfermedades inflamatorias del colon. Como puede verse en las Figuras 4, 5 y 6, cuando se estimula con bacterias patógenas (Salmonella) la relación de citoquinas antiinflamatorias a citoquinas proinflamatorias es similar a la de la muestra no estimulada de control o, de forma más típica, menor. Nuevamente, si bien esta diferencia no siempre alcanza  
 25 significación estadística, indica que la composición no es inhibidora de las enfermedades inflamatorias del colon.



**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* de selección de composiciones probióticas según su eficacia en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del colon que comprende las etapas de:
  - 5 a) tratar una muestra biológica que comprende, al menos, un tipo celular intestinal con la composición probiótica *in vitro*;
  - b) medir el nivel de, al menos, una citoquina antiinflamatoria y, al menos, una citoquina proinflamatoria en la muestra biológica después del tratamiento con la composición probiótica;
  - c) determinar la relación de, al menos, una citoquina antiinflamatoria a, al menos, una citoquina proinflamatoria en la muestra biológica después del tratamiento con la composición probiótica;

10 caracterizado por que una relación determinada según la etapa (c) de la muestra biológica tratada superior a la misma relación determinada en una muestra biológica de control sin tratar sometida a ensayo al mismo tiempo indica que la composición probiótica inhibe las enfermedades inflamatorias del colon, y una relación determinada según (c) igual o inferior a la relación de la muestra biológica de control sin tratar indica que la composición probiótica no inhibe las enfermedades inflamatorias del colon;

15 en el que dicha relación de citoquina antiinflamatoria a citoquina proinflamatoria es la relación interleucina-10/interleucina-12.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica comprende tejido linfoide asociado con el intestino.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el tejido linfoide asociado con el intestino comprende células del
 

20 nodo linfático mesentérico.
4. El método según las reivindicación 1 que comprende la etapa adicional de estimular la muestra biológica *in vitro* antes de la etapa (b).
5. El método según la reivindicación 4, en el que dicha estimulación *in vitro* comprende un mitógeno, un probiótico, una molécula anti CD3, y mezclas de los mismos.
- 25 6. El método según la reivindicación 5, en el que dicha estimulación *in vitro* comprende un mitógeno.
7. El método según la reivindicación 6, en el que dicho mitógeno comprende un lipopolisacárido, lectina, superantígeno, y mezcla de los mismos.
8. El método según la reivindicación 7, en el que dicha lectina comprende concanavalina A, fitohemaglutinina, mitógeno de *Phytophthora*, y mezclas de los mismos.
- 30 9. El método según la reivindicación 1, en el que los medios de medición de los niveles de dicha, al menos, una citoquina antiinflamatoria en dicha muestra biológica comprenden técnicas ELISA, análisis radioinmunológicos, técnicas de ELISA múltiple sobre plataformas de micromatrices, técnicas de ELISA múltiple con uso de microesferas codificadas en acoplamiento con sistemas de detección mediante citometría de flujo, análisis biológicos, transferencias Western, sistemas de separación mediante cromatografía, RT-PCR, PCR de
 

35 transcripción inversa competitiva, transferencias Northern, matrices de gen, medición directa de m-RNA, y mezclas de los mismos.
10. El método según la reivindicación 9, en el que los medios de medición de los niveles de citoquinas antiinflamatorias en dicha muestra biológica comprenden técnicas ELISA, técnicas de RIA, técnicas de ELISA múltiple con uso de microesferas codificadas en acoplamiento con sistemas de detección mediante citometría
 

40 de flujo, y mezclas de los mismos.
11. El método según la reivindicación 10, en el que los medios de medición de los niveles de dicha, al menos, una citoquina antiinflamatoria en dicha muestra biológica comprenden técnicas de ELISA múltiple con uso de microesferas codificadas en acoplamiento con sistemas de detección mediante citometría de flujo.
- 45 12. El método según la reivindicación 11, en el que los medios de medición de los niveles de dicha, al menos, una citoquina proinflamatoria en dicha muestra biológica comprenden técnicas ELISA, técnicas de RIA, técnicas de ELISA múltiple con uso de microesferas codificadas en acoplamiento con sistemas de detección mediante citometría de flujo, y mezclas de los mismos.
- 50 13. El método según la reivindicación 12, en el que los medios de medición de los niveles de dicha, al menos, una citoquina proinflamatoria en dicha muestra biológica comprenden técnicas de ELISA múltiple con uso de microesferas codificadas en acoplamiento con sistemas de detección mediante citometría de flujo.

Relación IL-10:IL-12 de PBMC correspondiente a pacientes con síndrome del intestino irritable antes y después de ser alimentados con Bifidobacterias

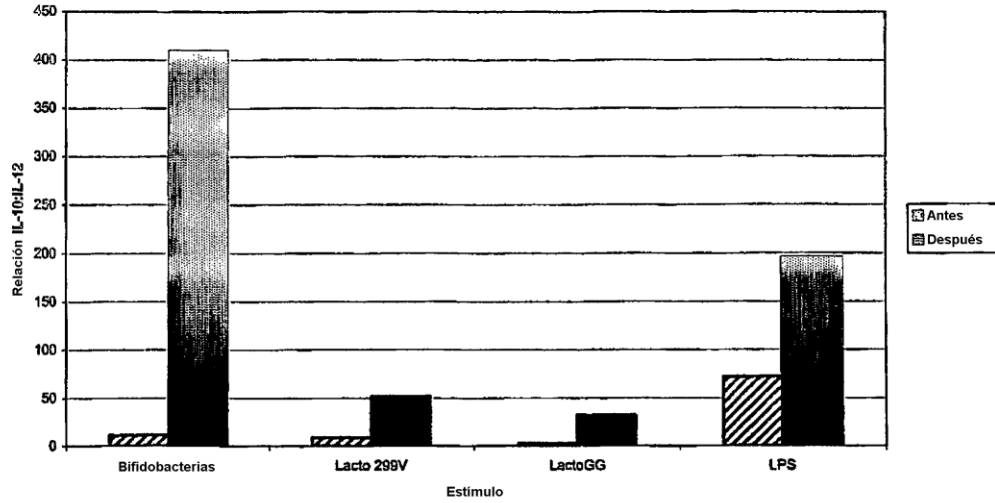


Figura 1

Relación IL-10:TNF- $\alpha$  en PBMC correspondiente a pacientes con síndrome del intestino irritable antes y después de ser alimentados con Bifidobacterias

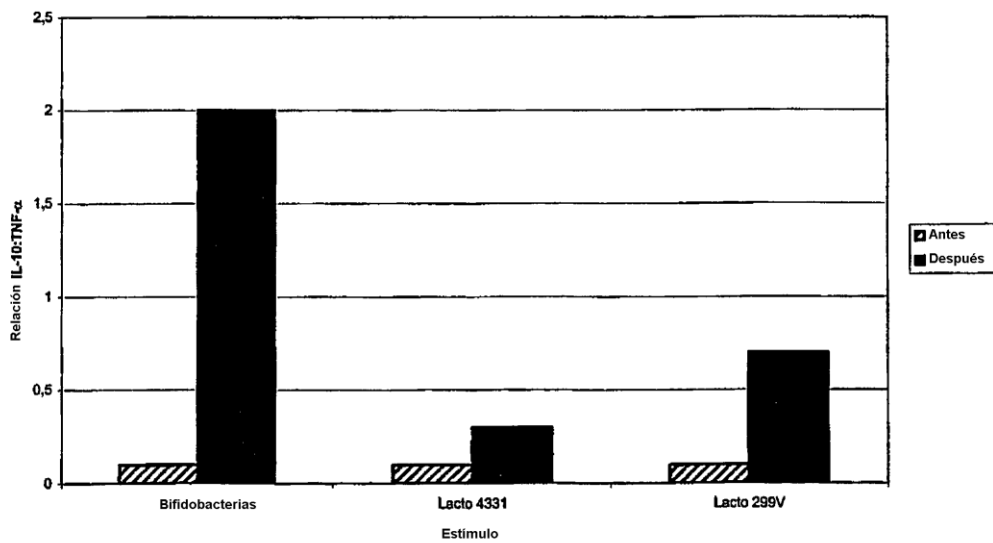


Figura 2

Relación IL-10:IFN- $\gamma$  de PBMC correspondiente a pacientes con síndrome del intestino irritable antes y después de ser alimentados con Bifidobacterias

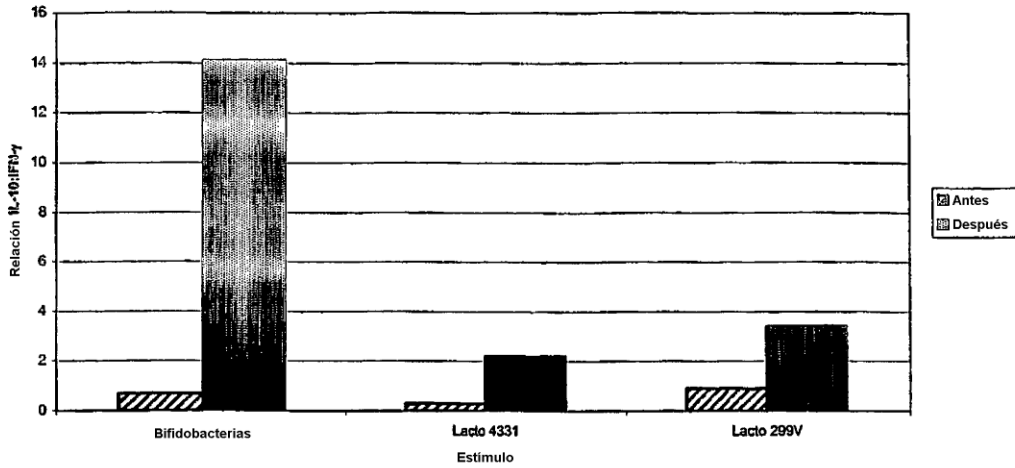


Figura 3

**CORRELACIÓN ENTRE EL CAMBIO EN LA RELACIÓN DE IL-10 A IL-12 Y EL CAMBIO EN EL DOLOR ABDOMINAL  
DIFERENCIA DE LOS VALORES MEDIDOS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO  
DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON BIFIDOBACTERIUM**

ESTÍMULO	DOLOR ABDOMINAL PUNTUACIÓN VAS	DOLOR ABDOMINAL PUNTUACIÓN LIKER
SIN ESTIMULACIÓN	-0,3457 (0,1150)	-0,3617 (0,0981)
BIFIDO 35624	-0,2698 (0,2247)	-0,2699 (0,2244)
LACTO 4331	-0,2938 (0,1845)	-0,2744 (0,2165)
FLORA AUTÓLOGA	-0,5168 (0,0196)	-0,4959 (0,0262)

Coefficiente de correlación de Pearson  $\rho$  ( $p$ -valor para la prueba  $\rho=0$ )

Tabla 1

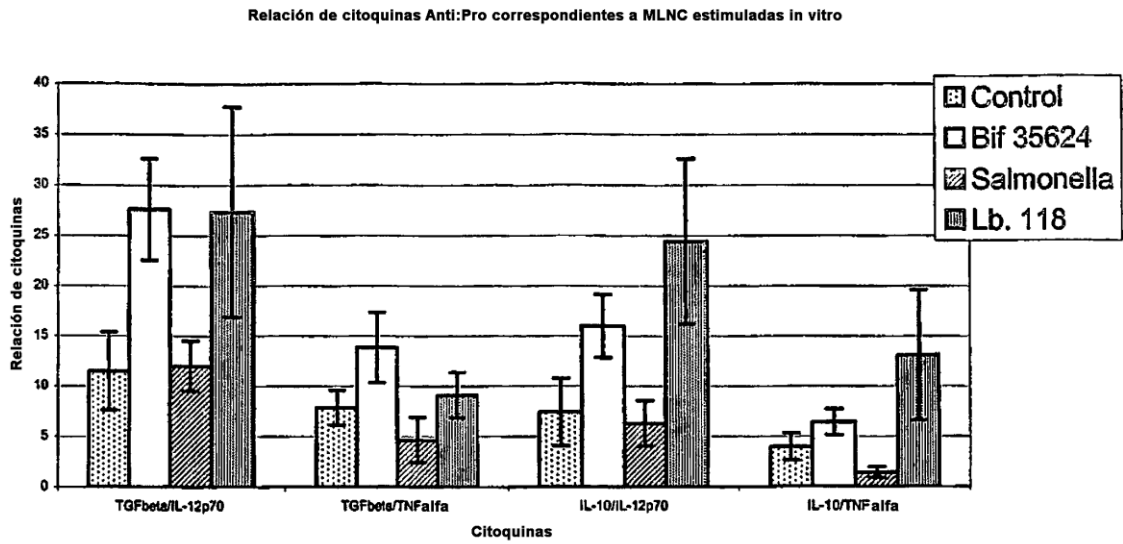


Figura 4

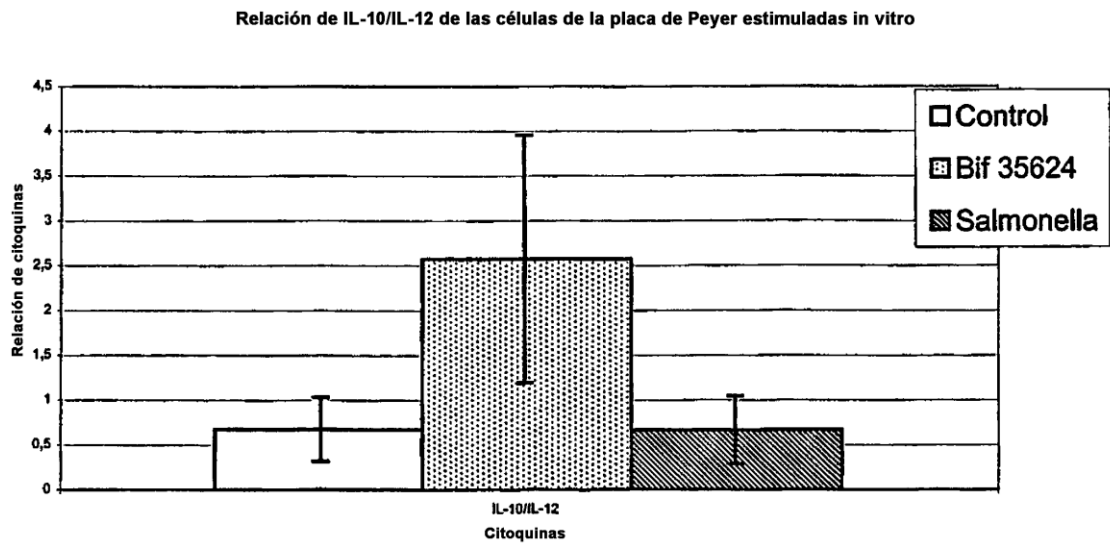


Figura 5

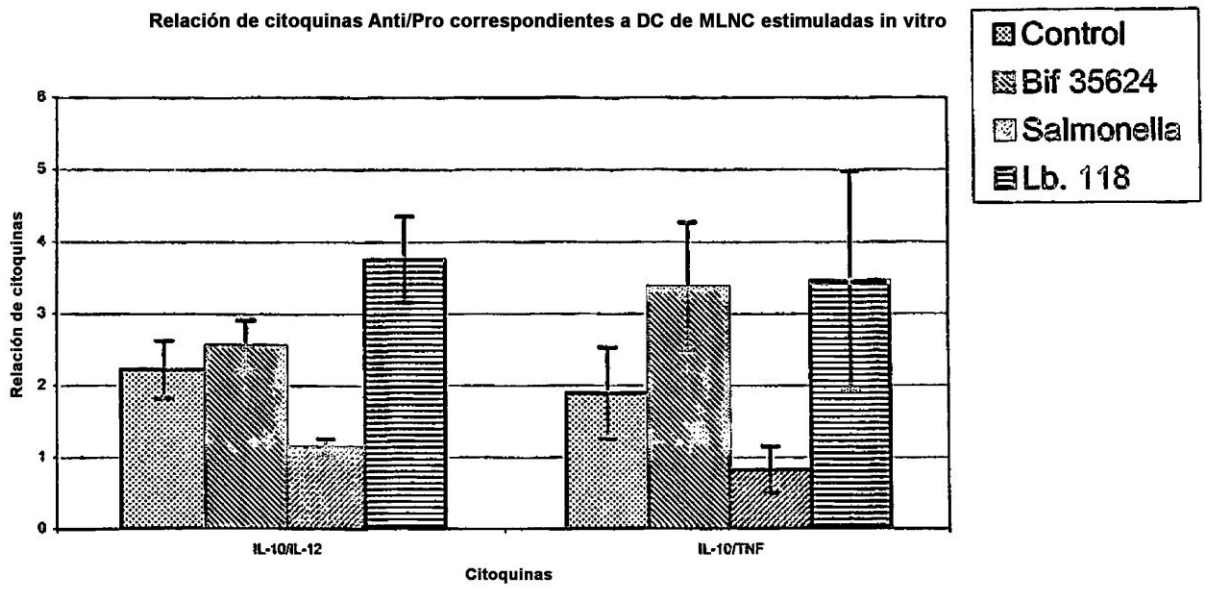


Figura 6