

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 765**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2006 PCT/SE2006/000434**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2006 WO06110088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2006 E 06733290 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 1868622**

54 Título: **Bacterias del ácido láctico para reducir la inflamación en mamíferos**

30 Prioridad:

15.04.2005 US 107438

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

27.03.2017

73 Titular/es:

**BIOGAIA AB (100.0%)
Tegnérgatan 15, Box 3242
103 64 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

CONNOLLY, EAMONN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 606 765 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

Bacterias del ácido láctico para reducir la inflamación en mamíferos

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 Esta descripción se refiere al uso de un método para la detección de cepas bacterianas antiinflamatorias no patógenas, y a productos y métodos que usan tales cepas para el tratamiento y la profilaxis de la inflamación no deseada provocada por determinadas bacterias u otros agentes que provocan inflamación.

Descripción de la técnica relacionada

15 Los monocitos abandonan la médula ósea y se desplazan a través de los vasos sanguíneos periféricos hasta que llegan a la mucosa/serosa del tracto gastrointestinal. Estos supuestos macrófagos son clave para la interacción y propagación de las señales necesarias para regular el sistema inmunitario del GI.

20 En el tracto gastrointestinal, hay un nivel constante de respuesta inmunitaria en los macrófagos del epitelio mucoso frente a las bacterias en la luz intestinal y unidas a la mucosa intestinal. En estado normal, esta respuesta implica la generación de señales de citocinas para restringir y contener una respuesta inflamatoria innecesaria. Sin embargo, cuando se presenta un patógeno o una toxina a estas células, forman la primera línea de defensa y reaccionan produciendo una cantidad creciente de citocinas proinflamatorias, que propagan la respuesta inflamatoria hasta que se elimina la amenaza. La generación de citocinas relevantes para las interacciones con bacterias comensales (que no representan una amenaza) así como las implicadas en la respuesta inflamatoria completa frente a patógenos, está sujeta a la intervención de las propias bacterias del ácido láctico (incluyendo antígenos de superficie) o de sustancias producidas por estas bacterias del ácido láctico y está claro que la flora comensal tiene una extensa interacción con los macrófagos de la mucosa para mantener una reacción equilibrada con respecto a la flora intestinal y mantener así una salud óptima (Rook GA, Adams V, Hunt J, Palmer R, Martinelli R, Brunet LR. Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. Springer Semin Immunopathol 2004; 25:237-255).

35 Se sabe que diversos patógenos pueden provocar inflamación, por ejemplo en el tracto gastrointestinal. Tal inflamación, por ejemplo, en el estómago y en el tracto gastrointestinal, está mediada por proteínas de señal intercelular conocidas como citocinas que las producen los macrófagos y las células dendríticas en el epitelio en respuesta a un estímulo antigénico tal como el producido por un patógeno. Tras el contacto entre el epitelio y el antígeno de un patógeno o endotoxinas producidas por el mismo, tales como LPS, las células presentadoras de antígeno (incluyendo células dendríticas) en el epitelio propagan la señal hasta macrófagos no expuestos que responden a continuación según una respuesta denominada de tipo Th-1 en las que los macrófagos producen citocinas proinflamatorias incluyendo TNF α , IL-1, IL-6, IL-12. Estas citocinas estimulan a su vez linfocitos citolíticos naturales, células T y otras células para producir interferón γ (IFN γ), que es el mediador clave de la inflamación. El IFN γ conduce a una intensificación de la respuesta inflamatoria y las reacciones descritas anteriormente que conducen a citotoxicidad. Los macrófagos no expuestos también pueden responder a antígenos con una respuesta de tipo Th-2. Esta respuesta la suprime IFN γ . Estas células de tipo Th-2 producen citocinas antiinflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-10.

50 Se sabe que IL-10 inhibe la producción de IFN γ y por tanto amortigua la respuesta inmunitaria. El equilibrio entre las células de tipo Th-1 y de tipo Th-2 y su respectiva producción de citocinas define la extensión de la respuesta inflamatoria frente a un antígeno dado. Las células de tipo Th-2 también pueden estimular la producción de inmunoglobulinas por el sistema inmunitario. La actividad antiinflamatoria en el tracto gastrointestinal, donde hay un nivel reducido de TNF α , se correlaciona con células epiteliales mejoradas (integridad del revestimiento de la pared intestinal) y por tanto con una reducción de los efectos negativos provocados por toxinas y patógenos gastrointestinales.

55 Los resultados de varios estudios de investigación indican que el ADN puede ejercer una acción antiinflamatoria en las células epiteliales intestinales, o puede estimular el sistema inmunitario (Madsen *et al.* y Rachmilewitz *et al.*, respectivamente, presentaciones de la Digestive Disease Week, 19-22 de mayo de 2002, The Moscone Center, San Francisco).

60 La inflamación está involucrada en muchas enfermedades en mamíferos tanto de manera externa en la piel, ojos, etc., como de manera interna por ejemplo en diversas membranas mucosas; en la boca, el tracto GI, la vagina, etc. pero también en los músculos, las articulaciones óseas y en el tejido cerebral. En el tracto GI hay muchas enfermedades relacionadas con la inflamación, por ejemplo, gastritis, úlcera y enfermedad inflamatoria del intestino (EII). EII es un trastorno crónico que provoca inflamación e hinchazón en el tracto digestivo o en la pared intestinal. Cuando el tracto digestivo se inflama o se hincha con EII, se forman llagas (úlceras) y sangran. Esto puede provocar

a su vez dolor abdominal, diarrea líquida, sangre en las heces, fatiga, reducción del apetito, pérdida de peso o fiebre. Por tanto, la inflamación en EI1 conduce a daño tisular tal como úlceras y enfermedad agravada en el paciente.

Las dos formas más comunes de EI1 son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (CD, *Crohn's disease*). La enfermedad de Crohn es una enfermedad crónica caracterizada por lesiones inflamatorias recurrentes de toda la pared intestinal de la mucosa a la serosa y puede afectar a muchos sitios en el intestino. La enfermedad se ha relacionado con desequilibrios en la microflora intestinal y una reacción inflamatoria sobreexpresada frente a componentes de la flora intestinal normal y esta reacción se trata actualmente con escaso éxito usando una serie de diferentes fármacos, uno de los cuales se basa en la terapia anti-TNF α diseñada para reducir los niveles de TNF α en la mucosa gastrointestinal. Por tanto, las personas con tal enfermedad forman un grupo de estudio ideal y de hecho un grupo objetivo para el uso de lactobacilos inmunomoduladores, atenuantes de la inflamación.

Los ratones desarrollan espontáneamente colitis crónica, lo que no se produce en animales libres de gérmenes. La colitis del ratón es similar a la enfermedad de Crohn humana, una enfermedad inflamatoria crónica grave del tracto gastrointestinal. La enfermedad de Crohn se produce generalmente en el intestino, pero también puede producirse en cualquier lugar del tracto gastrointestinal. Estos estados requieren la presencia de bacterias entéricas y son ambas formas de colitis dependientes de IL-12 y mediadas por Th1.

Debido a las similitudes de las causas y de los síntomas, los modelos de ratón de colitis y otros modelos de ratón se usan a menudo para estudiar directamente las componentes de la respuesta inflamatoria, y, como se supone que se aplican los mismos mecanismos en el hombre, a menudo se aceptan para usarse como modelos para desarrollar tratamientos para la enfermedad gastrointestinal humana. Sin embargo, hay algunas cuestiones sobre la relevancia de los modelos derivados de animales para los seres humanos, de modo que existe la necesidad de disponer de métodos alternativos para estudiar los mecanismos humanos y confirmar los resultados de otros modelos, en más sistemas basados en humanos. El propósito de la invención en el presente documento es el de proporcionar un método basado en células humanas para seleccionar bacterias del ácido láctico que muestren características antiinflamatorias y luego usar tales bacterias del ácido láctico seleccionadas para la profilaxis y el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias.

Lactobacillus reuteri es uno de los habitantes que se producen de manera natural del tracto gastrointestinal de los animales y se encuentra rutinariamente en el intestino de los animales sanos y a pesar del bajo pH, ocasionalmente también en el estómago de los seres humanos. Se sabe que tiene actividad antibacteriana. Véanse, por ejemplo las patentes estadounidenses n.ºs 5.439.678, 5.458.875, 5.534.253, 5.837.238 y 5.849.289. Cuando las células de *L. reuteri* están creciendo en condiciones anaerobias en presencia de glicerol, producen la sustancia antimicrobiana conocida como reuterina (β -hidroxi-propionaldehído). También se sabe que determinadas cepas de lactobacilos incluyendo *L. reuteri* tienen propiedades antiinflamatorias tal como se encuentra en las solicitudes de patente estadounidense 20040208863 y 20040067573. También se ha asociado otra actividad inmunomoduladora con otros lactobacilos diversos.

Ensayos clínicos en seres humanos y estudios en animales han demostrado que *Lactobacillus* puede prevenir o mejorar la inflamación en colitis crónica. Se plantea la hipótesis de que los lactobacilos pueden regular por disminución las respuestas de citocinas proinflamatorias inducidas por bacterias entéricas. J. Peña *et al* (2003) investigaron si los lactobacilos disminuyen la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) por una línea de macrófagos murinos. Se demostró que la producción de TNF- α por macrófagos murinos incubados con *Lactobacillus rhamnosus* GG y lipopolisacáridos se inhibió significativamente en comparación con los controles.

El mismo grupo de trabajadores investigó si *Lactobacillus* spp. podrían ser eficaces para mejorar la inflamación inducida por *Helicobacter in vivo*. Para ello, se realizaron experimentos de coinoculación con *L. reuteri* y *L. paracasei* en el modelo de colitis de ratón por *H. hepaticus*. Se observó una disminución significativa de las puntuaciones de patología en los ratones hembra que han recibido tanto *H. hepaticus* como *Lactobacillus* spp. en comparación con los animales a los que sólo se les administró *H. hepaticus*. Se demostró que el efecto probiótico de *Lactobacillus* spp. en este modelo era independiente de la exclusión de las bacterias *H. hepaticus*, pero que dependía de la regulación postranscripcional de la expresión de TNF- α . Los datos sugieren la existencia de un mecanismo novedoso por el cual *Lactobacillus* spp. pueden regular por disminución la producción de citocinas proinflamatorias inducida por *Helicobacter* en macrófagos.

La patente WO2004/031368A1 describe cepas de *Lactobacillus* seleccionadas por su capacidad para reducir la inflamación gastrointestinal asociada con la infección por *H. pylori* en mamíferos usando un ensayo de macrófagos de ratón para determinar la actividad de TNF- α .

El resumen de la reunión de Pena Jeremy A. *et al.*, Digestive Disease Week Abstracts and Itinerary Planner, vol. 2003 & Digestive Disease 2003; FI, Orlando, EE.UU.; 17-22 de mayo de 2003 da a conocer que algunas cepas de *Lactobacillus reuteri* disminuyen la producción de TNF-alfa en macrófagos estimulados con LPS. Se sugiere que la inhibición mediada por *Lactobacillus* entérico de la producción de citocinas proinflamatorias tiene un efecto inmunomodulador en el tracto gastrointestinal.

La solicitud de patente US20040057943A1 se refiere a un procedimiento para la selección de una nueva cepa probiótica de *L. coryniformis*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *L. gasseri* y *L. fermentum* que pueden sobrevivir en la leche materna y/o en el líquido amniótico.

S. Ménard *et al.* (2003) investigaron si las bacterias del ácido láctico secretaban metabolitos que conservaban propiedades antiinflamatorias después del transporte intestinal. Se realizó un análisis de la unión de LPS a promonocitos THP-1 en presencia de medio condicionado de bacterias (CM) para ver si el LPS tiene que unirse a la proteína de unión a LPS (LPB) antes de que LPS-LPB pueda reconocer el receptor CD14. La unión se midió mediante citometría de flujo. Se demostró que *Bifidobacterium* y *Streptococcus thermophilus* CM inhibían completamente la unión de LPS dependiente de LDB a células THP-1 liberando metabolitos que ejercían un efecto anti TNF- α que puede atravesar la barrera intestinal.

Aunque se conocen las diferencias en la capacidad de varios lactobacilos para reducir la inflamación, incluyendo la inflamación gastrointestinal, previamente no se sabía que estas diferencias se predicen mejor usando un modelo basado en células humanas y que se prefiere un modelo de este tipo para seleccionar tales cepas por su posible efecto en seres humanos.

Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar una cepa de bacterias del ácido láctico, que se ha seleccionado usando líneas celulares humanas, por su capacidad para reducir la inflamación, tal como la debida a EII. Es un objeto adicional de la invención proporcionar productos que contienen dicha cepa incluyendo agentes para el tratamiento o la profilaxis de la inflamación, por ejemplo asociados con EII para la administración a seres humanos, incluyendo medios condicionados en los que se ha hecho crecer dicha cepa. Por tanto, la invención se usa para tratar inflamación o úlceras provocadas por EII que conducen a daño tisular y enfermedad agravada en un paciente.

Otros objetos y ventajas resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la invención

La invención en el presente documento proporciona una cepa de bacterias del ácido láctico seleccionadas por su capacidad para reducir la inflamación, tal como enfermedad del intestino, y productos que contienen una cepa de este tipo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico de barras que muestra el efecto de medios condicionados de *Lactobacillus* sobre la producción de TNF- α por monocitos activados por LPS. Se incubaron tres cepas y los controles durante 24 horas.

La figura 2 es un gráfico de barras que muestra el efecto de medios condicionados de *Lactobacillus* sobre la producción de TNF- α por monocitos activados por LPS. Se incubaron tres cepas y los controles durante 9 horas.

La figura 3 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de medios condicionados de *Lactobacillus* sobre la producción de TNF- α por monocitos primarios activados por LPS. Se usaron monocitos primarios de pacientes CD-rem (remisión) y de CD-act (activos). Se cultivaron las cepas y los controles durante 24 horas.

La figura 4 es un gráfico de barras que muestra el efecto de medios condicionados de *Lactobacillus* sobre la producción de TNF- α por monocitos primarios activados por LPS. Se usaron monocitos primarios de pacientes CD-act. Se cultivaron las cepas y los controles durante 24 horas.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

La presente invención en el presente documento comprende una cepa de bacterias del ácido láctico que se han seleccionado por su capacidad para reducir la inflamación, tal como en EII.

Una cepa de este tipo es *Lactobacillus reuteri* MM4-1A, ATCC PTA-6475. Pueden formularse productos tales como alimentos, formulaciones y aditivos nutricionales, productos farmacéuticos o dispositivos médicos que contienen células completas o componentes derivados de esta cepa, tal como se conoce en la técnica, e incluyen generalmente un soporte ingerible tal como se conoce más la cepa de *Lactobacillus*, o su componente derivado. Las cepas previamente conocidas, ahora identificadas como cepas que tienen una buena capacidad de reducción de TNF α , tales como *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659 y otras, también pueden usarse en las formulaciones anteriores.

Se usan sistemas modelo que usan las citocinas apropiadas para determinar factores que reducen o aumentan la inflamación. En la invención proporcionada en el presente documento, se usa un ensayo basado en células

humanas.

Las células THP-1 son una línea celular monocítica humana derivada de un paciente con leucemia y que se mantienen en la Colección Americana de Cultivos Tipo. El origen de estas células de un huésped humano hace que sean particularmente relevantes para estudiar las interacciones del sistema inmunitario gastrointestinal humano con las bacterias comensales humanas.

Los datos de esta invención dan a conocer una indicación de una potente inhibición de la producción de TNF α por las cepas específicas *L. reuteri* ATCC PTA 4659 y *L. reuteri* ATCC PTA 6475 y que esta inhibición está mediada por una sustancia liberada en el medio de crecimiento por estas dos cepas específicas durante la fase de crecimiento logarítmica/estacionaria tardía. Por el contrario, otras dos cepas de *L. reuteri*, no solo no pudieron inhibir la respuesta inflamatoria de las células frente a toxina de *E. coli*, sino que tampoco inducían una respuesta inflamatoria por sí mismas. Este sorprendente hallazgo indica posibles propiedades antiinflamatorias de las cepas *L. reuteri* ATCC PTA 4659 y *L. reuteri* ATCC PTA 6475 que no pudo predecirse.

Para confirmar la posible relevancia clínica de estos hallazgos se realizaron estudios adicionales en células derivadas de la sangre de pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino, específicamente la enfermedad de Crohn (CD).

Para estudiar las interacciones entre las bacterias del ácido láctico y las células inmunitarias mucosas, se considera que los macrófagos diferenciados son un mejor modelo que los monocitos indiferenciados. Es más probable que tales macrófagos diferenciados se asemejen a la población de células de macrófagos *in vivo* del tracto gastrointestinal que responde a las bacterias del ácido láctico y provoca los cambios reguladores o inflamatorios del sistema inmunitario innato en el huésped. Por ejemplo, la producción de la interleucina-8 proinflamatoria por células THP-1 en respuesta a endotoxinas aumentó notablemente tras la inducción de la diferenciación (Baqui *et al.*, 1999) y además, la producción de TNF α por estas células aumenta significativamente después de la diferenciación (Klegeris *et al.*, 1997).

Las características de la presente invención se entenderán más claramente con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Selección de cepas antiinflamatorias.

Se incubaron células THP-1 junto con o bien medios de control o bien medios condicionados (L-CM) a partir del cultivo de cepas seleccionadas de *L. reuteri*, *L. reuteri* ATCC PTA 4659, *L. reuteri* ATCC PTA 6475, *L. reuteri* ATCC 55730 y *L. reuteri* CF48-3A. Los medios condicionados (L-CM) son sobrenadantes libres de células de cultivos de 9 horas o 24 horas de cada uno de los cultivos de *L. reuteri*. Se estimularon células THP-1 o bien con medio de control o bien con LPS derivado de *E. coli* (que conduce a la generación de TNF α en una respuesta inflamatoria normal) durante una incubación de 3,5 horas tras lo cual se retiraron las células y se sometieron a ensayo los sobrenadantes para determinar los niveles de TNF α usando una técnica ELISA.

Materiales:

Línea de células monocíticas leucémicas THP-1 (ATCC, número de cat. TIB202)

Medio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen)

Suero bovino fetal (Gibco-Invitrogen)

Disolución de penicilina-estreptomina (Sigma)

Lipopolisacárido de serotipo O127:B8 de *E. coli* (Sigma, número de cat. L3137)

Kit de desarrollo de ELISA DuoSet humano de TNF-alfa/TNF-SFII (R&D Systems, número de cat. DY210)

Método:

Usar la línea de células monocíticas THP-1. Añadir el 5% (v/v) de medios MRS y el 5% (v/v) de medio condicionado de *Lactobacillus* en los pocillos adecuados. El medio condicionado de *Lactobacillus* es el sobrenadante de un cultivo de 24 horas de especies de *Lactobacillus* en medios MRS. A continuación, se ajusta el pH del medio condicionado mediante secado por velocidad-vacío y se resuspende el sedimento en igual volumen de medio de cultivo. Aunque la cámara humidificada está diseñada para minimizar la evaporación de líquido, después de 48 horas de incubación, el volumen de la suspensión celular en las placas de 24 pocillos se reduce hasta aproximadamente 475 ml.

Añadir 100 ng/ml de lipopolisacárido de serotipo O127:B8 de *E. coli* en los pocillos adecuados. Incubar en una cámara del 5% de CO₂, humidificada, a 37°C. Después de 3,5 horas de incubación, recoger los cultivos en tubos para centrifuga de 1,5 ml. Centrifugar a 1500 RCF durante 5 minutos a 4°C. Recoger los sobrenadantes.

Prueba de expresión de citocinas mediante ELISA (DuoSet humano de TNF-alfa/ TNF-SFII Quantikine).

El medio de cultivo usado fue FBS al 10%, penicilina-estreptomocina al 2% en RPMI 1640.

Resultados--ejemplo 1

La incubación de células THP-1 con L-CM durante 24 horas a partir de las cepas *L. reuteri* ATCC PTA 4659, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 en ausencia de LPS no condujo a la generación de TNF α en el medio de incubación (figura 1). Sorprendentemente, L-CM a partir de *L. reuteri* ATCC 55730 y la cepa CF48-3A de *L. reuteri* estimularon la producción de TNF α por las células THP-1 hasta niveles similares a los observados con LPS solo. Por tanto, las cepas de *L. reuteri* difieren en su capacidad para estimular la producción de TNF α proinflamatorio por monocitos THP-1 en reposo.

La adición de LPS a las células THP-1 en ausencia de L-CM condujo a la generación de 138 pg/ml de TNF α durante el periodo de incubación de 3,5 horas. Esta es la respuesta inflamatoria esperada de las células THP-1 a la toxina. La adición del medio de crecimiento (MRS), que actúa como control para las adiciones de L-CM, condujo a la generación de 132 pg/ml de TNF α y por tanto MRS no interfirió en la respuesta a LPS. La adición de L-CM de 24 horas a partir de *L. reuteri* ATCC PTA 4659 o *L. reuteri* ATCC PTA 6475 redujo drásticamente los niveles de TNF α estimulado por LPS hasta tan sólo 14 y 10 pg/ml, respectivamente. Esto representa una inhibición de la producción de TNF α estimulada por LPS del 89 y el 92%, respectivamente. Por el contrario, en presencia de L-CM de 24 horas a partir de *L. reuteri* ATCC 55730 y la cepa CF48-3A de *L. reuteri*, LPS todavía pudo inducir un aumento significativo de TNF α en comparación con los niveles en ausencia de LPS. La producción de TNF α estimulada por LPS aumentó en el 50% y el 38% a pesar de la presencia de L-CM a partir de *L. reuteri* ATCC 55730 y la cepa CF48-3A de *L. reuteri*, respectivamente.

Experimentos similares realizados con LCM de 9 horas de *L. reuteri* ATCC PTA 4659 o *L. reuteri* ATCC PTA 6475 demostraron que el efecto inhibitor sobre la producción de TNF α estimulada por LPS era considerablemente menor (el 52% y el 16%, respectivamente; figura 2) pero todavía estaba ahí. Por lo tanto, las incubaciones más largas de las cepas de *L. reuteri*, con la recogida de L-CM en la fase de crecimiento logarítmica/estacionaria tardía, conducen a una eficacia mejorada en la inhibición de la producción de TNF α .

Ejemplo 2. Preparación de selección negativa para células monocíticas

El kit de aislamiento de monocitos II (Miltenyi Biotec, Inc. 12740 Earhart Avenue, Auburn, CA 95602 (800) 367-6227; <http://www.miltenyibiotec.com/index.php?>, número de pedido 130-091-153) es un sistema de marcaje magnético indirecto para el aislamiento de monocitos no afectados de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Las células no monocíticas, es decir, células T, células B, células NK, células dendríticas y basófilos se marcan magnéticamente de manera indirecta usando un cóctel de antibióticos conjugados con biotina contra CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 y glicoforina A, y microperlas anti-biotina. Entre las dos etapas de marcaje, no se requieren etapas de lavado. Las células no monocíticas marcadas magnéticamente se reducen reteniéndolas en una columna MACS $\text{\textcircled{R}}$ en el campo magnético de un separador MACS, mientras que los monocitos no marcados pasan a través de la columna. El aislamiento de monocitos no marcados relativamente enriquecidos se logra mediante la reducción de las células marcadas magnéticamente. Puede evaluarse o confirmarse el nivel de enriquecimiento mediante citometría de flujo.

Información sobre el kit: kit de aislamiento de monocitos II (número de pedido 130-091-153). Contenido del kit: Reactivo de bloqueo de FcR (1 ml); cóctel de anticuerpos anti-biotina (1 ml); microperlas anti-biotina (2 ml); materiales y equipos no suministrados en el kit: tubos para centrifuga de Corning de 15 ml; centrifuga refrigerada; pipetas y puntas de pipeta; pipeteadores serológicos y puntas de pipeta; cronómetro; columna MACS $\text{\textcircled{R}}$ MS de Miltenyi Biotec; imán MACS $\text{\textcircled{R}}$ de Miltenyi Biotec; soporte de columna MACS $\text{\textcircled{R}}$ de Miltenyi Biotec; hemocitómetro Bright-Line de Hausser Scientific; tampón de trabajo (WB): solución salina tamponada con fosfato 1X estéril (PBS, pH 7,4, número de catálogo Gibco 10010023) + albúmina sérica bovina al 0,5% (BSA, número de catálogo Panvera P2489) + ácido etilendiaminotetraacético 2 mM (EDTA, número de catálogo Gibco 15553-035)

Método (kit de aislamiento de monocitos II):

Determinar la densidad celular mediante recuento en un hemocitómetro. Transferir la suspensión celular a un tubo cónico de Corning de 15 ml. Sedimentar las células a 300 RCF durante 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C. Retirar el sobrenadante usando una pipeta serológica de 10 ml. Resuspender el sedimento celular en 30 μ l de WB por 10 7 células totales. Añadir 10 μ l de reactivo de bloqueo de FcR por 10 7 células totales. Añadir 10 μ l de cóctel de anticuerpo anti-biotina por 10 7 células totales. Mezclar bien e incubar durante 10 minutos a 4 $^{\circ}$ - 8 $^{\circ}$ C. Añadir 30 μ l de WB por 10 7 células totales. Añadir 20 μ l de microperlas anti-biotina por 10 7 células totales. Mezclar bien e incubar durante 15 minutos adicionales a 4 $^{\circ}$ - 8 $^{\circ}$ C. Lavar las células añadiendo un volumen de marcaje 10 - 20X de WB. Centrifugar a 300 RCF durante 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C. Retirar el sobrenadante usando una pipeta serológica de 2 ml. Resuspender el sedimento

celular en 500 µl de WB por 10⁸ células. Colocar la columna MACS MS sobre el imán.

Lavar la columna con 500 µl de WB. Cargar la suspensión de células en la columna. Dejar que drene a su través y a un tubo de recogida (~ 4 min/ml). Lavar la columna con 3 x 500 µl de WB y dejar que drene a su través al mismo tubo de recogida.

Eluir las células capturadas en otro tubo de recogida mediante la colocación de la columna en otro tubo, pipetear 1 ml de WB en la columna y purgar las células usando presión positiva con el émbolo suministrado con la columna. Presionar a una velocidad de 2 segundos/pulgada.

En el protocolo anterior es importante trabajar rápido y usar sólo disoluciones frías. Trabajar con hielo requiere un aumento de los tiempos de incubación para las microperlas MACS. Incubar en una nevera a 4^o- 8^oC. Los tampones o medios no deben contener Ca²⁺ o Mg⁺. BSA puede reemplazarse por otras proteínas tales como gelatina, albúmina sérica humana o suero fetal de ternera. El tipo de anticoagulante usado no afecta al protocolo. Temperaturas más altas y tiempos de incubación más largos pueden conducir a marcaje celular inespecífico.

Ejemplo 3. Bioensayo de monocitos primarios

Se aislaron monocitos humanos primarios de la sangre de pacientes con CD que estaban en una fase de inflamación activa (CD-act) o estaban en remisión (CD-rem) donde la inflamación había desaparecido. Se extrajo sangre de los pacientes con CD y se aislaron células mononucleares de sangre periférica. Se enriquecieron los monocitos de sangre periférica usando el método del ejemplo 2. Se permitió que las suspensiones de estos se diferenciaron durante 48 horas en una cámara del 5% de CO₂, humidificada, a 37^oC. Después de este procedimiento, las células se han desarrollado a macrófagos. A continuación se añadieron medios de crecimiento (control) o L-CM o bien a los monocitos de sangre periférica o bien a los macrófagos diferenciados y se estimularon las células o bien con medio de control o bien con LPS derivado de *E. coli* y se incubaron durante 3,5 horas. Se analizó la producción de TNF α en los sobrenadantes a partir de estas incubaciones.

Los materiales usados fueron: Monocitos primarios de sangre periférica; medio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen); suero bovino fetal (Gibco-Invitrogen); disolución de penicilina-estreptomina (Sigma); lipopolisacárido de serotipo O127:B8 de *E. coli* (Sigma, número de cat. L3137); ácido trans-retinoico (CalBioChem, número de cat. 554720); Kit de desarrollo de ELISA DuoSet humano de TNF-alfa/TNF-SFII (R&D Systems, número de cat. DY210).

se aíslan los monocitos de sangre periférica tal como se describe en los protocolos: protocolo de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (descrito en el ejemplo 2) y protocolo de selección negativa de monocitos (descrito en el ejemplo 2). Cambiar el medio de suspensión celular (PBS) a medios de cultivo celular (FBS al 10%, penicilina-estreptomina al 2% en RPMI 1640).

Diluir las células hasta 1,0 x 10⁵ células/ml. Sembrar en placa 500 µl de suspensión celular en cada pocillo de una placa de microtitulación de 24 pocillos. Permitir que las células se diferencien durante 48 horas en una cámara del 5% de CO₂, humidificada, a 37^oC. Comenzar el bioensayo. Añadir el 5% (v/v) de medios MRS y el 5% (v/v) de medios condicionados de *Lactobacillus* en los pocillos apropiados. Los medios condicionados de *Lactobacillus* son el sobrenadante de un cultivo de 24 horas de especies de *Lactobacillus* en medios MRS. A continuación, se ajusta el pH de los medios condicionados mediante secado por velocidad-vacío y se resuspende el sedimento en un volumen igual de medio de cultivo. Aunque la cámara humidificada está diseñada para minimizar la evaporación de líquido, después de 48 horas de incubación, el volumen de suspensión celular en las placas de 24 pocillos se reduce hasta aproximadamente 475 - 485 µl. Añadir 100 ng/ml de lipopolisacárido de serotipo O127:B8 de *E. coli* en los pocillos adecuados. Incubar en una cámara del 5% de CO₂, humidificada, a 37^oC. Después de 3,5 horas de incubación, recoger los cultivos en tubos para centrífuga de 1,5 ml. Centrifugar a 1500 RCF durante 5 minutos a 4^oC. Recoger los sobrenadantes. Someter a prueba para determinar la expresión de citocinas mediante ELISA (DuoSet humano de TNF-alfa/TNF-SFII Quantikine).

Resultados--ejemplo 3

En monocitos primarios de pacientes CD-rem, LPS condujo a la elevación esperada de TNF α y esta elevación pudo inhibirse en el 43% en presencia de L-CM a partir de *L. reuteri* ATCC PTA 6475. En monocitos primarios de pacientes CD-act, el nivel de producción de TNF α estimulada por LPS fue algo mayor y se inhibió en el mismo grado que L-CM a partir de *L. reuteri* ATCC PTA 6475 (figura 3).

En comparación con los controles de medio, la producción de TNF α en respuesta a LPS en macrófagos diferenciados derivados de monocitos primarios de pacientes CD-act se inhibió significativamente en el 50% por L-CM a partir de *L. reuteri* ATCC PTA 4659 y en el 60% por L-CM a partir de *L. reuteri* ATCC PTA 6475 (figura 4). Confirmando los datos de las células THP-1, L-CM derivados de *L. reuteri* ATCC 55730 y la cepa CF48-3A de *L. reuteri* no pudieron inhibir la producción de TNF α y por el contrario, aumentaron la producción de TNF α en el 22% y el 30%, respectivamente, en comparación con los controles relevantes (figura 4).

Estos datos confirman el sorprendente hallazgo de que las diferentes cepas de *L. reuteri* tienen efectos variables sobre la producción de TNF α por monocitos y macrófagos diferenciados y que las cepas de *L. reuteri* ATCC PTA 4659 y *L. reuteri* ATCC PTA 6475 son particularmente adecuadas para su uso en el tracto gastrointestinal de seres humanos con enfermedad inflamatoria del intestino.

Ejemplo 4. Uso del medio condicionado

Usando el método del ejemplo 1, se seleccionó el medio condicionado de una cepa que disminuye TNF α eficazmente, en este experimento el medio de *L. reuteri* ATCC PTA-4659. Este medio se produjo a mayor escala haciendo crecer la cepa en medio de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Difco, Sparks, MD). Se diluyeron cultivos de lactobacilos durante la noche hasta una DO₆₀₀ de 1,0 (que representa aproximadamente 10⁹ células/ml) y se diluyeron adicionalmente 1:10 y se hicieron crecer durante 24 horas adicionales. Se recogió el medio condicionado libre de células bacterianas mediante centrifugación a 8500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se separó el medio condicionado del sedimento celular y luego se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 μ m de poro (Millipore, Bedford, Mass.). Luego se liofilizó el medio condicionado y se formuló, usando métodos convencionales, para producir un comprimido. Éste comprimido se utilizó como fármaco en seres humanos para tratar eficazmente la úlcera provocada por EII.

Ejemplo 5. Uso de cepas de *Lactobacillus reuteri* antiinflamatorias seleccionadas

Usando el método del ejemplo 1, se seleccionó el medio condicionado de una cepa que disminuye TNF α eficazmente, en este experimento el medio de *L. reuteri* ATCC PTA-4659. Luego se liofilizó la cepa de *L. reuteri* y se formuló, usando métodos convencionales, para producir una cápsula. Esta cápsula se utilizó como fármaco en seres humanos para reducir eficazmente la inflamación de la mucosa en pacientes con EII provocada por EII.

Ejemplo 6. Caracterización de la proteína producida por cepas de *Lactobacillus* eficaces

Se trataron diferentes medios condicionados de *Lactobacillus* eficaces, incluyendo la cepa de *L. reuteri* ATCC PTA 4659, y el medio condicionado de *L. reuteri* ATCC PTA-6475, con diversos compuestos desnaturizantes para determinar la naturaleza de las supuestas inmunomodulinas derivadas de las bacterias. Por tanto, se sometieron los medios condicionados a congelación-descongelación repetidas, tratamiento térmico, digestión con enzimas de digestión de ADN, proteasas y proteasas inactivadas. Se determinó de este modo que la supuesta inmunomodulina era una o más proteínas o de naturaleza peptídica. Para determinar el tamaño de la supuesta proteína inmunomodulina, se fraccionó el medio condicionado mediante filtración y se sometieron a prueba los filtrados para determinar su eficacia. De esta manera, se encontró que el componente activo de los medios condicionados de cepas de *Lactobacillus* eficaces era de aproximadamente 5 kDa de tamaño o menos.

REIVINDICACIONES

1. Cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA-6475.
- 5 2. Producto que comprende medio condicionado de *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA-6475.
3. Cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1, o producto según la reivindicación 2, para uso en el tratamiento de úlceras provocadas por enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente humano.
- 10 4. Cultivo biológicamente puro según la reivindicación 1, o producto según la reivindicación 2, para uso en el tratamiento de inflamación debido a enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente humano.

Fig 1

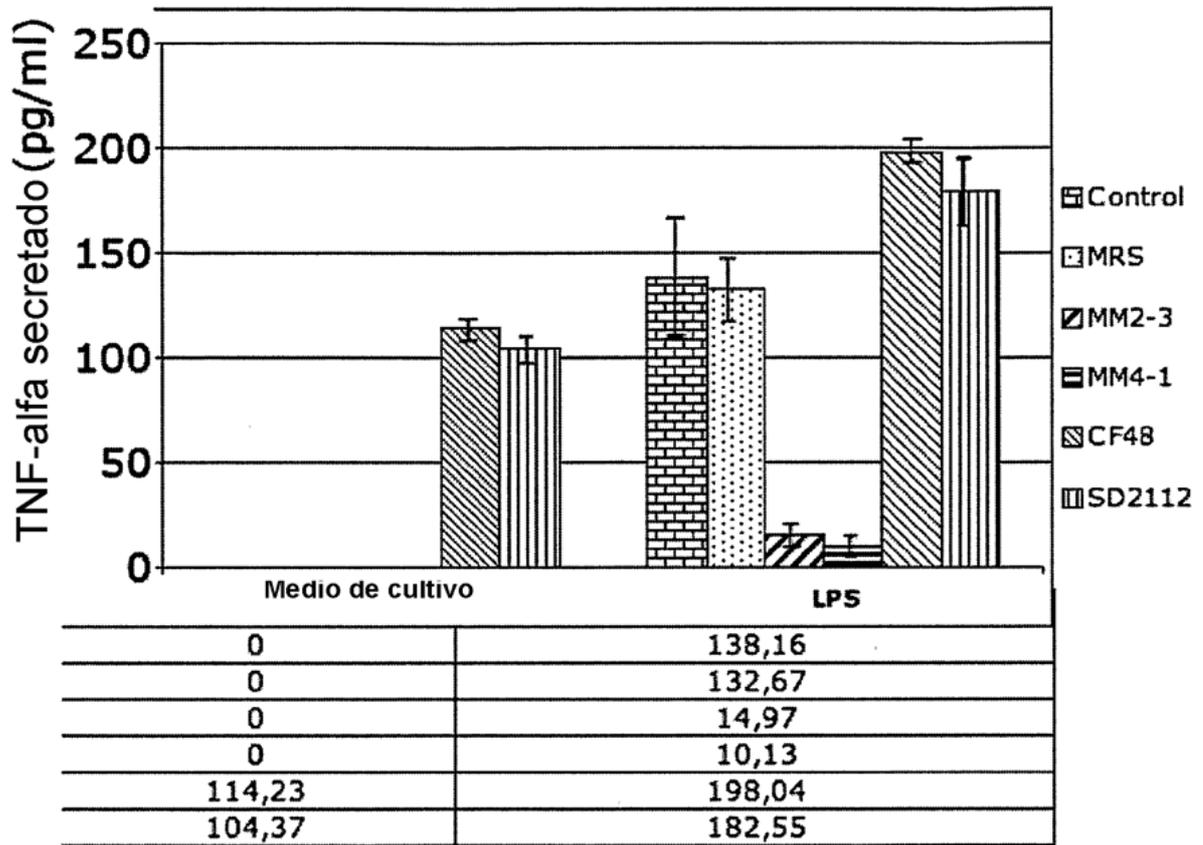
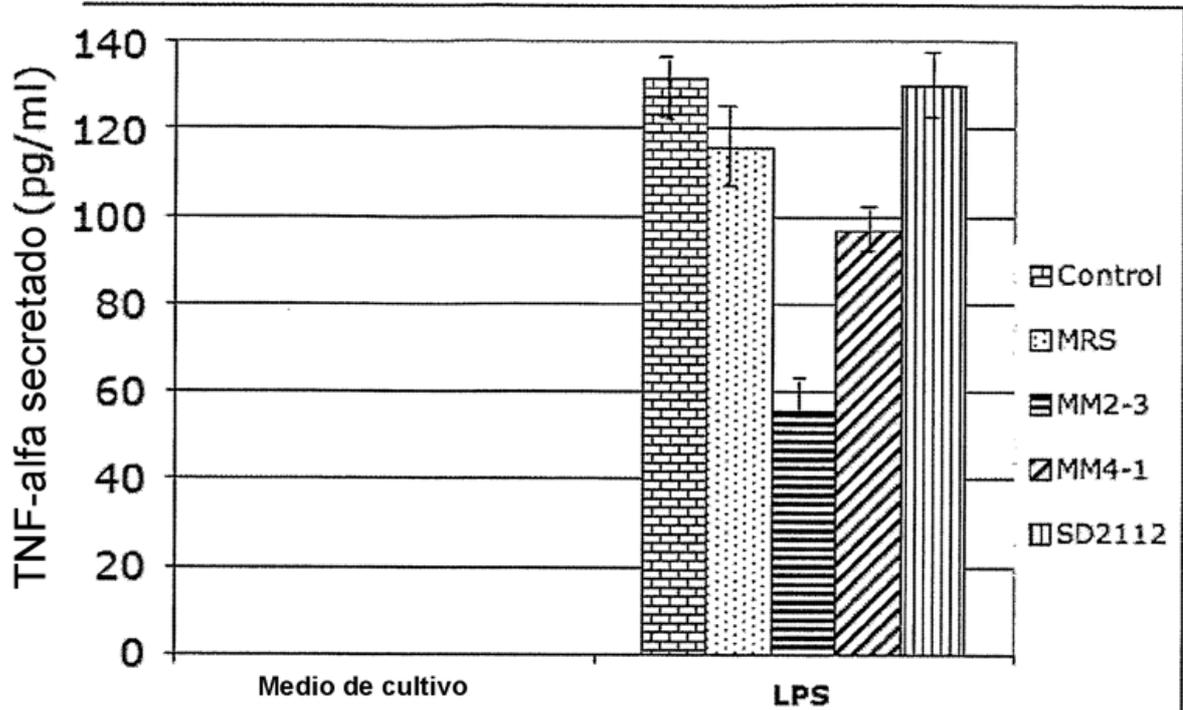
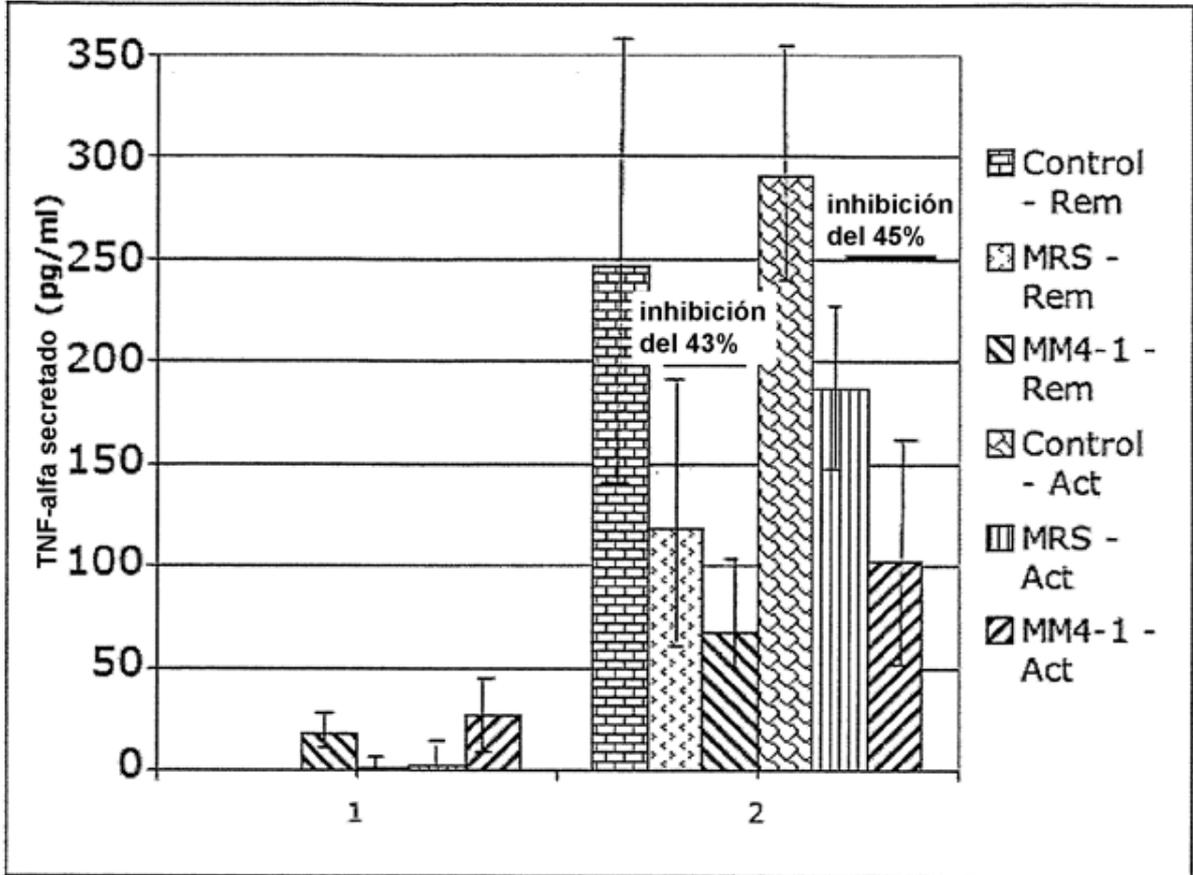


Fig 2



Control	0	131,32
MRS	0	115,77
MM2-3	0	55,59
MM4-1	0	96,83
SD2112	0	129,97

Fig.3



CD-R

	Sin control de LPS	Control de LPS
Control-Rem	0	246,5
MRS-Rem	0	118,2
MM4-1-Rem	17,82	67,84

CD-A

Control-Act	0,93	290,73
MRS-Act	2,62	186,49
MM4-1-Act	27,3	102,04

Límite de detección para ELISA de TNF-a: de 15 pg/ml a 1000 pg/ml

Fig.4

