

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 905**

51 Int. Cl.:

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2005 PCT/NL2005/000084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2005 WO05074978**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2005 E 05704614 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 1713541**

54 Título: **Uso de fosfatasa alcalina para la desintoxicación de LPS**

30 Prioridad:

04.02.2004 EP 04075344

04.02.2004 US 541363

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

18.07.2017

73 Titular/es:

AM-PHARMA B.V. (100.0%)

Rumpsterweg 6

3981 AK Bunnik, NL

72 Inventor/es:

BRANDS, RUDI y

POELSTRA, KLAAS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 624 905 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

Uso de fosfatasa alcalina para la desintoxicación de LPS

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la medicina y en particular al uso de enzimas desintoxicantes y neutralizantes de LPS. La presente invención se refiere además al campo de la farmacia y en particular al uso farmacéutico de enzimas de fosfatasa alcalina como se define en las reivindicaciones.

10

Antecedentes de la invención

15 Los lipopolisacáridos (LPS, denominados además endotoxinas) están presentes en las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas. Cuando el LPS se presenta en un organismo vertebrado estimula las respuestas inmunitarias innata y celular en una amplia variedad de tipos celulares. La producción de citocinas y quimiocinas (tales como TNF, diversas interleucinas, interferones y otros) atraerá y activará las células del sistema inmunitario, lo que puede culminar en última instancia en un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica inducida por LPS (SIRS) en determinadas condiciones.

20 Los LPS o endotoxinas son tóxicos para la mayoría de los mamíferos e independientemente de la fuente bacteriana, todas las endotoxinas producen la misma variedad de efectos biológicos en el huésped animal. La inyección de células Gram-negativas vivas o muertas, o LPS purificado, en animales experimentales produce un amplio espectro de reacciones fisiopatológicas no específicas, tales como: fiebre, taquicardia, taquipnea, hiper o hipotermia, cambios en el conteo de glóbulos blancos, coagulación intravascular diseminada, hipotensión, disfunción de órganos, y puede resultar incluso en shock y muerte.

30 La inyección de pequeñas dosis de endotoxina da como resultado una respuesta proinflamatoria en la mayoría de los mamíferos, pero el intervalo de respuesta a la dosis y su gradiente varían significativamente con las especies e incluso dentro de las especies pueden diferir significativamente en dependencia, por ejemplo, de la tolerancia al LPS. La secuencia de eventos proinflamatorios sigue un patrón regular (cascada inflamatoria): (1) período latente; (2) malestar fisiológico (diarrea, postración, shock); y en caso de choque séptico grave y fallo multiorgánico puede resultar en (3) la muerte. El tiempo en que ocurre la muerte varía según la dosis de la endotoxina, la vía de administración y la especie del animal.

35 Los efectos fisiológicos de la endotoxina están mediados principalmente por el motivo denominado lípido A de LPS. Dado que el lípido A está embebido en la membrana externa de las células bacterianas, sólo ejerce sus efectos tóxicos cuando se libera de las células multiplicadoras en forma soluble, o cuando las bacterias se lisan como resultado de la autólisis, el complemento y el complejo de ataque a la membrana (MAC), la ingestión y la muerte por fagocitos, o la muerte con determinados tipos de antibióticos. El LPS liberado al torrente sanguíneo puede ser neutralizado por muchos componentes de la sangre en un determinado grado, entre ellos varios lípidos y proteínas plasmáticas, entre ellos proteínas de unión a LPS. El complejo de proteína de unión a LPS interactúa con CD14 y receptores de tipo Toll en monocitos y macrófagos y a través de otros receptores en las células endoteliales. En los monocitos y macrófagos se desencadenan tres tipos de eventos durante su interacción con el LPS:

45 En primer lugar, la producción de citocinas, que incluyen IL-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF) y factor activador de plaquetas. Estas a su vez estimulan la producción de prostaglandinas y leucotrienos. Estos son mediadores poderosos de la inflamación y el choque séptico que acompaña a la toxemia por endotoxina. El LPS activa los macrófagos para aumentar la fagocitosis y la citotoxicidad. Los macrófagos se estimulan para producir y liberar enzimas lisosómicas, IL-1 ("pirógeno endógeno") y factor de necrosis tumoral (TNF alfa), así como otras citocinas y mediadores.

50 En segundo lugar, la activación de la cascada del complemento. C3a y C5a provocan la liberación de histamina (que conduce a vasodilatación) y el efecto de quimiotaxis y acumulación de neutrófilos. El resultado es la inflamación.

55 Finalmente, activación de la cascada de coagulación. La activación inicial del factor de Hageman (Factor de coagulación XII) puede activar varios sistemas humorales que dan lugar a la coagulación: una cascada de coagulación sanguínea que conduce a coagulación, trombosis, coagulación intravascular diseminada aguda, que agota las plaquetas y diversos factores de coagulación lo que resulta en sangramiento interno y además activación de la vía alternativa del complemento (como se explicó anteriormente, que conduce a la inflamación). Se activa la plasmina, lo que conduce a fibrinólisis y hemorragia, y la activación de quinina libera bradicininas y otros péptidos vasoactivos que provocan hipotensión. El efecto neto es la inducción de inflamación, coagulación intravascular, hemorragia y shock.

60 El LPS actúa además como un mitógeno de células B al estimular la diferenciación policlonal y multiplicación de las células B y la secreción de inmunoglobulinas, especialmente IgG e IgM.

- Las actividades fisiológicas del LPS están mediadas principalmente por el componente denominado Lípido A del LPS. El lípido A es un potente modificador de la respuesta biológica que puede estimular el sistema inmunitario de mamíferos. Durante una enfermedad infecciosa provocada por bacterias Gram-negativas, las endotoxinas liberadas de las células multiplicadoras, o parte de estas, tienen efectos similares en los animales y contribuyen significativamente a los síntomas y la patología de la enfermedad encontrada. Se ha dilucidado la estructura primaria del lípido A y se ha sintetizado químicamente el lípido A. Su actividad biológica parece depender de una conformación peculiar determinada por el disacárido de glucosamina, los grupos PO₄, las cadenas acilo y además el núcleo interno que contiene KDO de la molécula de LPS.
- La fosfatasa alcalina (AP), se ha descrito anteriormente como una enzima clave en la desfosforilación del LPS (endotoxina) en condiciones fisiológicas tanto in vitro como in vivo como una respuesta natural para desintoxicar y neutralizar el LPS (patente de Estados Unidos 6,290,952, Poelstra y otros, Am J Pathol., 1997 Oct; 151(4): 1163-9).
- Los informes sobre la actividad enzimática de AP implican su pH extremadamente alto óptimo para los sustratos exógenos usuales y su localización como ectoenzima. Las endotoxinas son moléculas que contienen varios grupos fosfato y usualmente están presentes en el espacio extracelular. La AP es capaz de desfosforilar este producto bacteriano a niveles de pH fisiológicos, mediante la eliminación de grupos fosfato de, entre otros, el motivo tóxico que es el lípido A del LPS. Como los residuos de fosfato en el motivo del lípido A determinan la toxicidad de la molécula, el efecto del inhibidor de AP levamisol in vivo mediante el uso de un modelo de septicemia en la rata confirmó la especificidad de la AP para el LPS que contiene grupos fosfato (Poelstra y otros, 1997). Los resultados demostraron que la inhibición de la AP endógena por el levamisol reduce significativamente la supervivencia de ratas inyectadas por vía intraperitoneal con bacterias *E. coli*, a la vez que este fármaco no influye en la supervivencia de ratas que reciben una dosis subletal de la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, lo que demuestra un papel crucial para esta enzima en la defensa del huésped. Los efectos del levamisol durante las infecciones de bacterias Gram-negativas y la localización de la AP como ectoenzima en la mayoría de los órganos, así como la inducción de la actividad enzimática durante las reacciones inflamatorias y la colestasis, están de acuerdo con este papel protector.
- La fuente principal de exposición al LPS en el cuerpo humano son los microorganismos Gram negativos que viven dentro del tracto digestivo o gastrointestinal humano (GI). Hay muchas más bacterias en el sistema digestivo que las presentes en la piel u otras partes del cuerpo, por lo que el tracto GI y la mucosa GI son la principal vía de entrada de LPS a la circulación. Un adulto promedio porta aproximadamente 100 billones de bacterias en los intestinos, la mayoría de las cuales se localizan en el colon, contribuyendo a 1-1,5 kg de su peso corporal. Existen más de 400 especies de bacterias que se encuentran en el sistema digestivo. Éstas incluyen tanto especies beneficiosas (comensales) como potencialmente dañinas (patógenas), que compiten continuamente para mantener una flora intestinal bien equilibrada.
- Las superficies mucosas, y en particular (pero sin limitaciones) la mucosa intestinal, están expuestas a esta amplia variedad de bacterias comensales y potencialmente patógenas, entre las cuales están muchas bacterias Gram-negativas productoras de endotoxina/LPS, tales como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Chlamydia* y otros patógenos principales. El epitelio intestinal es de particular importancia ya que forma una barrera dinámica que regula la absorción de nutrientes y agua y al mismo tiempo restringe la entrada de microbios y otros materiales nocivos como el LPS desde el lumen intestinal.
- Está bien establecido que una fracción importante del flujo de LPS desde el lumen del intestino a través del revestimiento de la mucosa hacia la circulación de un cuerpo vertebrado está mediada a través de quilomicrones (Harris y otros, 1998, 2000, 2002). De manera coincidente con la ingestión de lípidos y la introducción de quilomicrones en la circulación, capaces de portar LPS, se informa de un aumento significativo en la AP linfática derivada del tracto gastrointestinal (Nauli y otros, 2002). El flujo de LPS a través de la barrera GI se incrementa normalmente con una dieta rica en grasa saturada. El LPS se inserta con su cadena acilo del lípido A en los fosfolípidos de lipoproteínas. De esta manera, el LPS pasa la barrera intestinal mediante migración conjunta con quilomicrones, que se absorben predominantemente en el íleon del intestino delgado (Harris y otros, 2002). Después de una ingesta de alimentos ricos en grasas, en la linfa se detecta además un aumento significativo de la AP anclada al glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) formando complejos con lipoproteínas (Nauli y otros, 2003).
- Los roles fisiológicos y la interpretación de los niveles séricos de AP no están claros, pero un papel en la desintoxicación de LPS ha surgido de la investigación actual. La presencia conjunta tanto de AP como LPS en fracciones ricas en quilomicrones sugiere un papel de la AP en la desfosforilación del LPS derivado del intestino ya en estrecha proximidad. La desintoxicación puede tener lugar tanto en el lumen intestinal como en el camino hacia el hígado, o tras la presentación en este, específicamente en este contexto a las células de Kupffer y los hepatocitos, que limpian los quilomicrones de la circulación.
- El aumento de los niveles séricos de AP se asocia con daño hepático. Tras una agresión con endotoxina, la AP circulante se redirige a los hepatocitos, lo que reduce de esta manera los niveles de AP circulante inicialmente (Bentala y otros, 2002) a través de la captación mediada por receptores (receptor de asialoglicoproteína). Los hepatocitos también eliminan rápidamente los quilomicrones cargados con LPS de la circulación (Harris y otros, 2002) con un tiempo de vida media de 5-10 minutos. Después el LPS se elimina a través de la excreción biliar, lo que impide de esta manera

la activación de las células de Kupffer, las cuales son un objetivo principal para el LPS circulante (Harris, 2002). Bentala y otros, 2002, mostraron que las células de Kupffer también acumulan AP en modelos animales retados con LPS. Esto puede implicar que en condiciones normales las células de Kupffer no se activarán ya que el LPS (el motivo de lípido A), o su derivado MPLS (MPLA, derivado del Lípido A), se presenta principalmente a los hepatocitos a través de un receptor de lipoproteína y después se elimina por secreción biliar. Sin embargo, en condiciones con exceso de LPS, las células de Kupffer se activan a través de un receptor TLR-4 (LPS).

Una amplia variedad de animales tienen AP y varias otras entidades presentes para contrarrestar una agresión (bacteriana), ya sea local o sistémica, las que se inducen o están disponibles como función de vigilancia/defensa. Entre otros, los neutrófilos o macrófagos activados expresan una amplia variedad de mediadores inflamatorios destinados a neutralizar la agresión. Se ha descrito que motivos tales como, pero sin restricciones, la proteína de unión a LPS (LBP), CD14, Apo-E, VLDL, HDL, albúmina, inmunoglobulina y AP, todos realizan esta función. Sin embargo, cuando dicha agresión no se supera, por ejemplo, en el caso de una agresión grave de bacterias Gram negativas o positivas, los mediadores inflamatorios resultantes pueden iniciar un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

Se postuló que la AP se agota como consecuencia de su acción catalítica hacia el LPS (Poelstra y otros, 1997). Esto implica que posteriormente los niveles normales deben restaurarse a través de un mecanismo controlado. En pacientes que padecen de septicemia, se ha observado que el aumento de la AP sérica puede estar precedido de reducción de los niveles séricos de AP (Manintveld y Poelstra, solicitud de patente EP 989626940) y que la AP circulante se eliminaría de la circulación tras la interacción con LPS (Bentala y otros, 2002). Por lo tanto, el aumento en los niveles de AP posteriores puede ser un mecanismo de retroalimentación en respuesta a esta reducción de AP. Hasta la fecha no se ha descrito un mecanismo para tal capacidad de respuesta de LPS/AP.

En los procesos inflamatorios se encuentran aumentos (temporales) en la AP sérica. En el contexto de esta invención, tal aumento de AP se considera como una respuesta natural del sistema inmunitario innato a una agresión por LPS para hacer frente a estas agresiones y restablecer el equilibrio natural. El aumento de los niveles plasmáticos de AP es el resultado de la liberación masiva de AP desde los hepatocitos en respuesta a la agresión por LPS. Se ha observado que el LPS induce la actividad de la fosfolipasa-D (Locati y otros, 2001) que a su vez se ha informado que actúa sobre las proteínas ancladas al GPI, entre las que se incluyen AP (Deng y otros, 1996) y, por ejemplo, CD14 lo que libera de esta manera las proteínas a la circulación (Zhang F y otros, 2001, Locati M. y otros, 2001).

Por lo tanto, la AP plasmática circulante -predominantemente la AP de tipo hepática sin anclaje (Ahn y otros, 2001)- puede ya haber ejercido su actividad desintoxicante de LPS en la superficie de la membrana plasmática y posteriormente se libera de la membrana de los hepatocitos a la circulación antes de su eliminación posterior de la circulación mediante, por ejemplo, la ruta de asialo glicoproteína.

La AP ejerce su actividad catalítica hacia el LPS principalmente en la vecindad de una membrana, posiblemente en las llamadas balsas lipídicas (drm o fracción de membrana resistente al detergente) donde se ha informado que se localiza. Varias publicaciones favorecen tal actividad catalítica de AP en la superficie de membranas, ya sea presentada a nivel de tejido o liberada a la circulación como con fragmentos circulantes de membrana plasmática hepática (LPMF) (por ejemplo Deng y otros, 1996). El aumento de los niveles de AP observados en los pacientes inflamados crónicamente puede estar provocado por la desintoxicación subóptima del influjo de LPS derivado del intestino, que frecuentemente aumenta en condiciones patológicas antes de la movilización de la AP hepática.

El tratamiento de enfermedades inflamatorias representa un porcentaje sustancial del costo médico en bruto en los países desarrollados y la incidencia de estas enfermedades inflamatorias está en aumento continuo debido a factores clave como el envejecimiento de la población y un número creciente de pacientes con un sistema inmunitario deprimido como consecuencia de medicamentos y tratamiento de una amplia variedad de enfermedades como enfermedades cardíacas, trastornos de autoinmunidad y alergias, trasplantes de órganos, quimioterapia o radioterapia contra el cáncer y enfermedades infecciosas como el SIDA. Hasta cierta medida, estas enfermedades se relacionan con un influjo de LPS bacteriano. El influjo de LPS frecuentemente aumenta por la afección médica de un sujeto, que provoca un proceso inflamatorio por un sistema inmunitario innato defectuoso o no equilibrado, que constituye la primera línea de defensa contra, por ejemplo, agresiones microbianas, en particular de bacterias productoras de LPS/endotoxinas.

La presente invención tiene como objeto proporcionar composiciones para la desintoxicación, neutralización o formación de complejos del LPS in situ en tejidos mucosos en cavidades corporales antes que el LPS pueda pasar a través de la capa mucosal y entrar en la circulación donde provocaría efectos tóxicos y/o una respuesta inflamatoria.

Descripción

Definiciones:

Las endotoxinas son parte de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Las endotoxinas se asocian invariablemente con bacterias Gram-negativas sean los organismos patógenos o no. Aunque el término "endotoxina" se utiliza ocasionalmente para referirse a cualquier toxina bacteriana asociada a células, está

reservado adecuadamente para referirse al lipopolisacárido o complejo LPS asociado con la membrana externa de bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia* (*E. coli*), *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* (*Ps. Aeruginosa*), *Neisseria* (*N. meningitidis*), *Haemophilus* (*H. influenzae*), *Chlamydia* (*Chl. Pneumoniae*), *Helicobacter* (*H. pylori*) y otros patógenos principales.

5

Los lipopolisacáridos son moléculas anfifílicas complejas con un peso molecular monomérico de aproximadamente 10 kDa, que varían ampliamente en la composición química tanto entre las especies bacterianas como dentro de ellas. El LPS consiste en tres componentes o regiones, Lípido A, un polisacárido R y un polisacárido O. El lípido A contiene la región hidrófoba de anclaje a membrana del LPS. El lípido A consiste en un dímero fosforilado de N-acetilglucosamina (NAG) con 6 o 7 ácidos grasos (FA) unidos. El antígeno del núcleo (R) o polisacárido R se une a la posición 6 de una NAG. El antígeno R consiste en una cadena corta de azúcares. Normalmente están presentes dos azúcares inusuales, la heptosa y el ácido 2-ceto-3-desoxioctonóico (KDO), en el polisacárido núcleo. KDO es único y está presente invariablemente en el LPS y por lo tanto ha sido un indicador en los ensayos de LPS (endotoxina).

10

Con pequeñas variaciones, el polisacárido núcleo y el lípido A son comunes a todos los miembros de un género bacteriano (por ejemplo *Salmonella*), pero son estructuralmente distintos en otros géneros de bacterias Gram-negativas. *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia* tienen núcleos similares pero no idénticos.

15

La actividad biológica de la endotoxina se asocia con el lipopolisacárido (LPS). La toxicidad se asocia con el componente lipídico (Lípido A) y la inmunogenicidad se asocia con los componentes polisacáridos. Los antígenos de la pared celular (antígenos O) de las bacterias Gram-negativas son componentes del LPS. El LPS induce una variedad de respuestas inflamatorias en un animal. Debido a que activa el complemento por la vía alternativa (properdina), frecuentemente es parte de la patología de las infecciones de bacterias Gram-negativas.

20

El ensayo de Limulus (LAL) es un bioensayo bien conocido en la técnica para medir las concentraciones y la toxicidad del LPS. El ensayo se basa en un sistema de defensa primitivo exquisitamente sensible del antiguo cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*. Un ensayo basado en este sistema puede medirse mediante un cambio de color después de la escisión de sustratos cromogénicos o fluorogénicos. LAL puede usarse para medir cantidades de sub-picogramos de estos productos microbianos muy rápidamente con un equipamiento mínimo y puede detectar organismos vivos, muertos y no cultivables. Las células sanguíneas de *Limulus*, o amebocitos, del cangrejo herradura constituyen una defensa inmunitaria "innata" primitiva, que se une a las estructuras de la pared celular externa de la célula microbiana y provoca una reacción de coagulación de la sangre. Se ha demostrado que el LPS soluble, así como los componentes de la pared celular de otros microbios, tales como los beta glucanos en levaduras y hongos, provocan que la sangre del cangrejo herradura se coagule. Se sabe ahora que esta reacción de coagulación es una cascada enzimática cuyos componentes están presentes en gránulos dentro del amebocito. Un lisado de los amebocitos se produce mediante la recolección de células sanguíneas con un método estéril, sin endotoxina y que está disponible como un producto comercial (LAL, Charles River Endosafe, Charleston, SC) utilizado actualmente como un ensayo para LPS y desintoxicación de LPS mediante enzimas AP y composiciones que comprenden fuentes de AP.

25

30

35

Fosfatasa alcalina (AP): EC 3.1.3.1 de acuerdo con la Nomenclatura de Enzimas según la IUBMB, el nombre común es fosfatasa alcalina (AP), una enzima que cataliza la reacción de un monoéster de fosfato + H₂O = un alcohol + fosfato. Otros nombres para la AP son fosfomonoesterasa alcalina; fosfomonoesterasa; glicerofosfatasa; fosfohidrolasa alcalina; fenil fosfatasa alcalina; fosfohidrolasa de monoéster ortofosfórico (alcalina óptima). El nombre sistemático de la AP es fosfato-monoéster fosfohidrolasa (alcalina óptima).

40

45

La AP es una enzima de amplia especificidad, que además cataliza transfosforilaciones. En humanos y otros mamíferos, se conocen al menos cuatro fosfatasas alcalinas distintas pero relacionadas. Estas son fosfatasa alcalina intestinal, placentaria, similar al tipo placentario, y de hígado/hueso/riñón (o sin especificidad tisular). Las tres primeras se encuentran juntas en el cromosoma 2, mientras que la forma no específica del tejido se encuentra en el cromosoma 1. Las funciones fisiológicas exactas de las AP no se conocen, pero la AP parece estar involucrada con un gran número de procesos fisiológicos, entre los cuales está la desintoxicación de LPS a través de la desfosforilación del motivo de lípido A determinante de la toxicidad del LPS. Para la presente invención, el término fosfatasa alcalina puede comprender cualquier enzima que muestre desintoxicación de LPS según se determina por un ensayo de *Limulus* u otro bioensayo. La actividad de una enzima AP o composición o preparación que comprende AP puede determinarse por desintoxicación de LPS disponible comercialmente (por ejemplo Lipopolisacárido (LPS) de Sigma, núm. de catálogo L-8274) in vitro, seguido por un ensayo de *Limulus* estándar (LAL) antes y después del tratamiento con AP. Alternativamente, la reducción de la toxicidad del LPS mediante la actividad de AP puede cuantificarse por un bioensayo como se describe por Beumer y otros, 2003.

50

55

La mucosa es una membrana secretora de moco que recubre todas las cavidades o pasajes del cuerpo que se comunican con el exterior. La mucosa es un tejido húmedo que reúne muchos órganos (como los intestinos) y las cavidades corporales (como la nariz, la boca, los pulmones, la vagina, el conducto biliar, el esófago) y secreta moco (un fluido espeso). La mucosa, o membrana mucosa, es un tipo de tejido que protege las cavidades corporales de las condiciones ambientales, patógenos y sustancias tóxicas y generalmente son tejidos húmedos bañados por secreciones (tales como las secreciones en el intestino, pulmón, nariz, boca y vagina).

60

65

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención está dirigida a proporcionar composiciones para la desintoxicación de LPS in situ en tejidos mucosos en cavidades corporales. Un primer objetivo de la desintoxicación in situ del LPS en las superficies mucosas del cuerpo es prevenir o reducir la respuesta inflamatoria local en tales superficies. Además, el LPS que se desintoxica de esta manera ya no está disponible para pasar a través de las capas mucosas y por lo tanto no puede entrar en la circulación donde ejercería sus efectos tóxicos y/o provocaría una respuesta inflamatoria local y/o sistémica adicional. La desintoxicación puede comprender además la neutralización o la formación de complejos del LPS por la AP, que por estrecha proximidad puede formar una composición detoxificada. Los métodos comprenden el uso de fuentes de fosfatasa alcalina, conocidas por ser un medio potente para la desintoxicación de LPS. Una fuente de AP puede ser cualquier enzima AP, o cualquier composición que comprenda la enzima AP y cualquier medio que pueda producir una enzima AP funcional en el contexto de la presente invención, tal como ácidos nucleicos ADN o ARN que codifican una enzima AP. El ácido nucleico que codifica una AP puede incorporarse en vectores adecuados tales como plásmidos, fagémidos, fagos, (retro)virus, transposones, vectores de terapia génica y otros vectores capaces de inducir o conferir producción de AP. También microorganismos nativos o recombinantes, tales como bacterias, hongos, protozoos y levaduras pueden aplicarse como una fuente de AP en el contexto de la presente invención.

20 En una primera modalidad, la invención proporciona composiciones para usar en el método para la prevención o reducción de la toxicidad del LPS en un revestimiento mucoso de una cavidad corporal de mamífero que comprende la etapa de administrar una fuente de AP en la capa mucosa. La invención se refiere además al uso de AP como se definió anteriormente, o al uso de una composición que contiene una fuente de fosfatasa alcalina como se definió anteriormente. La fuente de AP se usa para la fabricación de un medicamento para la administración de AP en una capa mucosa para la prevención o reducción del influjo del LPS tóxico a través de un revestimiento mucoso de una cavidad corporal de mamífero. En una modalidad adicional, la invención proporciona un método para la prevención o reducción del influjo del LPS tóxico a través de un revestimiento mucoso de una cavidad corporal de mamífero que comprende la etapa de administrar una fuente de AP en la capa mucosa.

30 En particular, el método antes mencionado de administrar una fuente de AP en las capas mucosas de cavidades corporales es adecuado para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades mediadas o exacerbadas por LPS, aunque el método también puede usarse ventajosamente en sujetos sanos como tratamiento profiláctico dirigido a la prevención de la toxicidad inducida por LPS y/o enfermedades inducidas o exacerbadas por LPS. Los efectos beneficiosos de la administración de AP para reducir los niveles tóxicos de LPS en las cavidades corporales y en las capas mucosas de acuerdo con la presente invención generarán un efecto general promotor de la salud independientemente de la condición médica del sujeto tratado. El efecto promotor de la salud puede aumentarse aún más por la disminución posterior del influjo de LPS a través de las capas mucosas. Una enfermedad mediada o inducida por LPS puede ser cualquier enfermedad, síntoma o grupo de síntomas provocados por la toxicidad del LPS. Una enfermedad exacerbada por LPS puede ser cualquier enfermedad o síntoma que no es causado directamente por el LPS o por la toxicidad del LPS, sino una enfermedad cuyos síntomas y características clínicas pueden agravarse por el LPS y el estado clínico del sujeto que padece tal enfermedad empeora por LPS y por la toxicidad del LPS.

45 En la presente se describe además una composición para usar en un método destinado al tratamiento de enfermedades mediadas o exacerbadas por LPS seleccionadas del grupo que consiste en: sepsis/choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), meningococcemia, trauma/choque hemorrágico, lesiones por quemaduras, cirugía cardiovascular/derivación cardiopulmonar, cirugía/trasplante hepático, enfermedad hepática, pancreatitis, enterocolitis (necrotizante), enfermedad periodontal, neumonía, fibrosis quística, asma, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad renal, síndrome urémico hemolítico, diálisis renal, enfermedades autoinmunitarias, cáncer, Alzheimer, artritis reumatoide, lupus, lupus eritematoso sistémico.

50 La endotoxina circulante se ha detectado en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, particularmente en pacientes diagnosticados con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Su presencia es la consecuencia del daño a la mucosa intestinal y aumento del influjo de LPS o translocación intestinal y provoca o exagera la respuesta inflamatoria en los intestinos. La translocación bacteriana intestinal y la translocación intestinal de LPS también se observa en pancreatitis aguda y enfermedades hepáticas provocadas por cirrosis, abuso de alcohol, ictericia obstructiva y otras afecciones hepáticas. La endotoxina se ha implicado además en el desarrollo de la enfermedad periodontal, donde penetra en el epitelio gingival/mucosa, y provoca una respuesta inflamatoria local. En una modalidad preferida, el método comprende la administración oral de una fuente de AP para reducir la toxicidad de LPS y/o el paso de LPS a través de la mucosa.

60 El modo de administración preferido comprende el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden fuentes de AP, que pueden administrarse en un régimen de dosis diarias para reducir los niveles de LPS tóxicos en el lumen del tracto GI durante un período prolongado de tiempo. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas comprenden un revestimiento entérico para proteger la AP de los efectos perjudiciales de los jugos gástricos (pH 1,0 a 2,5) y asegurar un suministro eficaz de AP en la mucosa del tracto intestinal. Con mayor preferencia, la composición farmacéutica es una fuente de AP comprendida dentro de un revestimiento entérico.

Los revestimientos entéricos detienen la liberación del compuesto activo de las formas de dosificación ingeribles oralmente. En dependencia de la composición y/o el espesor, los revestimientos entéricos son resistentes al ácido del estómago durante los períodos de tiempo requeridos antes de que comiencen a desintegrarse y permitan la liberación lenta de AP (fármaco) en el estómago inferior o en la parte superior del intestino delgado. Ejemplos de algunos revestimientos entéricos se describen en la patente de Estados Unidos núm. 5,225,202. Los ejemplos de revestimientos entéricos comprenden cera de abejas y monoestearato de glicerilo; cera de abejas, goma laca y celulosa, opcionalmente con un copolímero neutro de ésteres de ácido polimetacrílico; copolímeros de ácido metacrílico y metilésteres de ácido metacrílico o copolímero neutro de ésteres de ácido polimetacrílico que contienen estearatos metálicos (para referencias de revestimientos entéricos ver las patentes de Estados Unidos núms. 4,728,512, 4,794,001, 3,835,221, 2,809,918, 5,225,202, 5,026,560, 4,524,060, 5,536,507). La mayoría de los polímeros de revestimiento entérico comienzan a volverse solubles a pH 5,5 y superiores, con unas velocidades de solubilidad máximas a pH por encima de 6,5. Los revestimientos entéricos pueden comprender además etapas de subrevestimiento y revestimiento externo, por ejemplo para composiciones farmacéuticas destinadas a un suministro específico en el tracto GI inferior, es decir, en el colon (pH 6,4 a 7,0, íleon pH 6,6), en oposición a un pH en el intestino superior, en el duodeno del intestino delgado el pH varía de 7,7 a 8 (después de los jugos pancreáticos y la adición de la bilis). Las diferencias de pH en los intestinos pueden ser explotadas para dirigir la composición de AP con revestimiento entérico a un área específica en el intestino. Permite además la selección de una enzima AP específica que sea más activa a un pH particular en el intestino. Por ejemplo, la CIAP (AP intestinal de ternero) y la AP de placenta humana (HPLAP) son las más activas a un pH alcalino de 8,2 en el duodeno, yeyuno e íleon del intestino delgado, mientras que la AP derivada de la leche y la AP de hueso/hígado/riñón o sin especificidad tisular (AP TSN) son más activas a pH neutro y se adaptan mejor para el tratamiento del colon (pH 7,4).

Los tejidos mucosos de mayor preferencia para tratar de acuerdo con la presente invención son los tejidos mucosos que recubren las cavidades corporales del tracto intestinal. La AP administrada por vía oral se suministra en los tejidos mucosos del tracto GI, que comprende esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon) e intestino grueso o colon (ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, colon sigmoide, recto y ano). Dentro del alcance de la presente invención, además los tejidos mucosos que recubren la boca, los conductos biliares y el páncreas forman parte del tracto intestinal y pueden tratarse de acuerdo con el método de la presente invención.

Las composiciones que comprenden una fuente de AP de acuerdo con la presente invención son particularmente adecuadas para la administración oral para prevenir, tratar, reducir, tratar o aliviar enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal. Las enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal pueden inducirse y/o exacerbarse significativamente por el influjo de LPS. Una reducción en la cantidad de LPS tóxico en el lumen de los intestinos mediante la administración de fuentes de AP, a través de la desintoxicación del motivo de lípido A del LPS, da lugar a una disminución correspondiente en el influjo sistémico de LPS tóxico en la circulación de un sujeto. En una modalidad de mayor preferencia, la administración oral de fuentes de AP es particularmente preferida para la profilaxis o el tratamiento de las siguientes enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal: enfermedad de Crohn, colitis, enterocolitis (necrotizante), colitis ulcerosa, enfermedad hepatobiliar, hepatitis B, hepatitis C, cirrosis hepática, fibrosis hepática, inflamación de los conductos biliares, obstrucción biliar, pancreatitis, pancreatitis aguda, peritonitis y enfermedad periodontal.

En otra modalidad de la invención, una fuente de AP se administra oralmente a sujetos que padecen de un aumento de la permeabilidad mucosal del tracto gastrointestinal. El aumento de la permeabilidad mucosal del tracto GI es frecuentemente el resultado de una disminución de la perfusión o isquemia de los intestinos. La isquemia, falta del suministro de oxígeno por el torrente sanguíneo, puede ser provocada por insuficiencia cardíaca, lesiones, trauma o cirugía. La isquemia de los intestinos da como resultado un mal funcionamiento de la mucosa y un consiguiente aumento del influjo o la translocación de LPS tóxico desde el intestino, que da como resultado toxicidad local y sistémica e inflamación. La toxicidad y la respuesta inflamatoria pueden incluso aumentar aún más la permeabilidad de la mucosa, lo que da como resultado un círculo vicioso. El aumento de la permeabilidad de la mucosa del tracto GI puede ser el resultado de enfermedades inflamatorias intestinales u otras condiciones patológicas del tracto GI. La administración oral de fuentes de AP de acuerdo con la presente invención reducirá o suprimirá significativamente este aumento del influjo de LPS tóxico mediante desintoxicación de LPS en el lumen de las cavidades intestinales. La administración exógena de AP romperá el círculo vicioso del influjo de LPS a través de la mucosa, la inflamación y el aumento de la permeabilidad de la mucosa que da lugar a un aumento del influjo de LPS. La disminución de la perfusión o la isquemia de los intestinos y un aumento concomitante de LPS se observa en el siguiente grupo de enfermedades o afecciones: quemaduras, traumatismos y/o heridas que pueden ser el resultado de accidentes, heridas de bala o cuchillo, cirugía y en particular cirugía con derivación cardiopulmonar. Además el mal funcionamiento de la función cardíaca, tal como en cardiopatía congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad coronaria y cardiopatía isquémica puede dar lugar a isquemia de los intestinos y un aumento del influjo de LPS. Una modalidad preferida de la presente invención es el tratamiento de sujetos que padecen este grupo de enfermedades y afecciones con una administración oral oportuna y regular de composiciones que comprenden una fuente de AP para prevenir o reducir el influjo de LPS a través de la mucosa intestinal con una aumento de la permeabilidad para LPS.

En otra modalidad, la presente invención está dirigida a proporcionar una fuente de AP en el revestimiento mucoso del tracto respiratorio. El tracto respiratorio es otra cavidad corporal con un revestimiento mucoso que se expone a los efectos tóxicos del LPS. El LPS, libre o asociado a bacterias inhaladas, penetra en la mucosa bronquial y pulmonar del tracto respiratorio mediante la respiración normal, por inhalación por ejemplo de partículas de polvo, o por infecciones de las vías respiratorias y tejidos mucosos con bacterias gram negativas. Además, se sabe que el tabaco es una fuente rica en LPS y fumar, de manera pasiva o activa, también puede contribuir significativamente a la carga de LPS de la mucosa bronquial y pulmonar. En condiciones normales este LPS se desintoxica por el sistema de defensa inmunitario mucosal local en el tracto respiratorio. Por lo tanto, en otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a la administración de una fuente de AP por inhalación, a la mucosa bronquial y pulmonar para prevenir o reducir el influjo de LPS a través de la mucosa del tracto respiratorio para las condiciones donde las respuestas de defensa normales al LPS no funcionan bien. La presente invención proporciona además composiciones adecuadas para la administración de AP en la mucosa bronquial y pulmonar. Estas composiciones se administran preferentemente para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio. En una modalidad de mayor preferencia, se aplica una administración pulmonar de una fuente de AP de acuerdo con la presente invención para tratar o prevenir una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en neumonía, infecciones pulmonares, asma, CARA, fibrosis quística, bronquitis y enfisema. En la presente se describen además dispositivos de atomización cargados con una composición que comprende una fuente de AP y opcionalmente diversos excipientes tales como propelentes, portadores, nebulizadores y/o difusores, adecuados para la administración de AP en la mucosa pulmonar y bronquial. Los dispositivos de atomización, los inhaladores y los nebulizadores se conocen en la técnica de las formulaciones farmacéuticas y serán evidentes para el experto en la técnica, referencia Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia, PA. 17ma ed. 1985.

Aún en otra modalidad, la presente invención está dirigida a la administración tópica de una fuente de AP a una capa mucosa que reviste una cavidad corporal. En una modalidad preferida, la cavidad corporal es la cavidad nasal, cavidad oral, vagina o recto. La administración tópica de una fuente de AP a un tejido mucoso que reviste una cavidad corporal se aplica preferentemente para tratar enfermedades inflamatorias locales o sistémicas y se prefiere particularmente para el tratamiento o la profilaxis de infecciones de las cavidades nasal, vaginal, oral o rectal, enfermedades e infecciones de transmisión sexual, infecciones del tracto urinario, infecciones de la vejiga y enfermedad periodontal.

La presente invención proporciona además composiciones que comprenden una fuente de AP, entre las que se encuentran composiciones farmacéuticas y nutracéuticas que comprenden una fuente de AP. Las composiciones pueden comprender opcionalmente excipientes, estabilizadores, activadores, portadores, permeadores, propelentes, desinfectantes, diluyentes y conservantes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados se conocen comúnmente en la técnica de las formulaciones farmacéuticas y pueden encontrarse y aplicarse fácilmente por el experto en la técnica, referencias, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia PA, 17ma ed. 1985. En una modalidad preferida, las composiciones que comprenden una fuente de AP son adecuadas para la administración oral y comprenden un revestimiento entérico para proteger la AP de los efectos adversos de los jugos gástricos y el pH bajo. Las formulaciones de revestimiento entérico y de liberación controlada se conocen bien en la técnica (referencias como las descritas anteriormente). Las composiciones de revestimiento entérico en la técnica pueden comprender una solución de un polímero de revestimiento entérico soluble en agua mezclado con el o los ingredientes activos tales como AP y otros excipientes, los cuales se dispersan en una solución acuosa y posteriormente pueden secarse y/o comprimirse. El revestimiento entérico formado ofrece resistencia al ataque a la AP por la humedad atmosférica y el oxígeno durante el almacenamiento y por los fluidos gástricos y el pH bajo después de la ingestión, a la vez que se descompone fácilmente en las condiciones alcalinas que existen en el tracto intestinal inferior.

Las composiciones que contienen AP para el suministro de AP a los tejidos mucosos para la desintoxicación de LPS de acuerdo con la presente invención comprenden preferentemente una AP eucariótica, con mayor preferencia una AP de mamífero, que puede ser de los tipos de AP sin especificidad tisular, tal como del tipo de hígado-hueso o riñón, o con especificidad tisular, tal como la AP placentaria y AP intestinal. Con mayor preferencia, la AP de mamífero es una AP humana o una AP de bovino.

En una modalidad preferida de la presente invención, la fuente de AP es AP que se produce o se aísla preferentemente a partir de la leche, preferentemente leche bovina. La leche puede obtenerse de animales que se han cruzado o modificado genéticamente para producir niveles elevados de AP en su leche en comparación con animales de tipo silvestre. La preparación de fracciones enriquecidas en AP a partir de la leche se conoce en la técnica. Por ejemplo, la fracción enriquecida o derivada de la membrana de los glóbulos de la leche es la fracción de leche enriquecida en AP preferida y puede obtenerse rutinariamente mediante el desnatado convencional de la leche cruda. La AP aislada de la leche puede formularse en composiciones farmacéuticas y en composiciones alimenticias o en nutracéuticos.

En una modalidad preferida, la composición que contiene AP para la administración oral de AP a la mucosa del tracto gastrointestinal de acuerdo con la presente invención es un producto alimenticio o nutracéutico enriquecido en AP. En una modalidad, el producto alimenticio puede ser una planta, fruto o verdura, opcionalmente modificados genéticamente para contener un mayor nivel de AP. En otra modalidad, el producto alimenticio o nutracéutico que contiene AP es un producto lácteo. En particular, las preparaciones y composiciones que contienen leche no pasteurizada o sus fracciones,

preferentemente leche bovina, contienen altos niveles de AP y son particularmente adecuadas para la administración oral como una fuente de AP de acuerdo con la presente invención.

En la presente se describe además un método para la preparación de un producto lácteo enriquecido en AP, preferentemente leche, una fracción de leche o producto lácteo. El método comprende el fraccionamiento de leche cruda, preferentemente leche bovina, la pasteurización de las fracciones que no contienen o no son ricas en AP y reformular dichas fracciones con las fracciones ricas en AP, no pasteurizadas, para obtener un producto lácteo menos perecedero y enriquecido en AP. Las fracciones ricas en AP no pasteurizadas pueden esterilizarse mediante otros medios, tales como, pero sin limitaciones, irradiación con rayos UV, X o gamma, filtración, presión, presión osmótica, productos químicos o antibióticos, asegurando que la enzima AP permanezca sustancialmente activa y que la fracción de leche se vuelva sustancialmente estéril. Este producto lácteo puede usarse en composiciones o administrarse directamente a sujetos que padecen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o inflamación mediadas o exacerbadas por LPS. Sin embargo, el producto lácteo enriquecido en AP puede ofrecerse además a sujetos sanos como un producto farmacéutico o nutracéutico para la reducción de LPS tóxico en el tracto gastrointestinal y para la reducción del influjo de LPS a través de la mucosa gastrointestinal.

Ejemplos

Ejemplo 1

La presente invención, y en particular la eficacia de las enzimas AP, preparaciones y composiciones, y diferentes modos de administración de AP, pueden ensayarse en diversos modelos animales para enfermedades inflamatorias intestinales que se conocen en la técnica. Los modelos animales que imitan la EII humana comprenden colitis inducida por antígeno y colitis inducida por microbios; otras formas inducibles de colitis, modelos de colitis por químicos (por ejemplo, ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) en Montfrans y otros, 2002), inmunológica, física y genética (modelos transgénicos y por desactivación, ver por ejemplo ratones SCID, Davis y otros, 2003, ratones KO para IL-10, Rennick y otros, 2000, ratón SAMP1/Yit, Kosiewicz, y otros, 2001 y Strober y otros, 2001); modelos de transferencia adoptiva y modelos de colitis espontánea (Kosiewicz, M.M. y otros, 2001).

El modelo de colitis por dextran sulfato sódico (DSS) inducido químicamente se describió originalmente por Okayasu y otros; *Gastroenterology*, 1990: 98, 694-702, y es un modelo para la colitis ulcerosa humana. El modelo comprende colitis ulcerosa aguda y crónica en ratones causada por la administración de DSS al 3-10 % en su agua potable. Los cambios morfológicos y los cambios en la microflora intestinal son similares a los observados en casos clínicos de colitis ulcerosa. El daño en el colon se desarrolla debido a un efecto tóxico del DSS en las células epiteliales y a la fagocitosis por células de la lámina propia, lo que da como resultado la producción de TNF-alfa e IFN-gamma.

Diseño experimental para la colitis aguda por DSS:

El DSS (PM 40 000 obtenido de ICN chemicals) se disuelve en agua potable acidificada en una concentración del 5 % (p/v) y se administra ad libitum a ratones hembras Balb/c (Harlan). La solución se cambia todos los días. Después de 7 días de tratamiento, los ratones tratados y control pueden sacrificarse y se analizan los intestinos. Se disecciona todo el colon (desde el ciego hasta el recto) y se registra su longitud. Aproximadamente la mitad del colon se congela en nitrógeno líquido y se obtienen criosecciones para el estudio de la morfología (tinción con HE). Las pequeñas partes del bazo y el hígado también se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido con fines inmunohistoquímicos. Una pequeña parte del colon se utiliza para preparar homogenados de tejido para las mediciones de citocinas. Se cultivan pequeñas tiras de colon en RPMI/FCS al 10 % durante 24 h en ausencia o presencia de LPS. La secreción de citocinas (TNF alfa, IL-1 beta, IFN gamma) en el sobrenadante se mide mediante el uso de ensayos ELISA específicos. El bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos se diseccionan y se trituran para preparar suspensiones de células individuales. Se diseccionan 4 placas de Peyer cerca del colon y se obtienen suspensiones de células individuales mediante el uso de colagenasa. Las células se caracterizan mediante técnicas de citometría de flujo. Las células del bazo se cultivan durante 24 h en RPMI/FCS al 10 % en ausencia o presencia de LPS o Con A. Se mide la secreción de citocinas (TNF alfa, IL1 beta, IFN gamma) en el sobrenadante mediante el uso de ensayos ELISA específicos. Se recolectan heces y se cultivan en placas de agar McConkey para determinar el contenido de enterobacterias. Para el contenido total de bacterias aerobias, las heces se cultivan en placas de agar sangre.

Resultados

Los ensayos descritos anteriormente se usan para determinar la eficacia de composiciones que comprenden AP in vivo. Se observan reducciones en la secreción de citocinas; se miden disminuciones en los niveles de TNF alfa, IL-1 beta e IFN gamma en los intestinos inflamados tras la administración oral de la fracción de membrana de glóbulos de la leche rica en fosfatasa alcalina de leche bovina.

Ejemplo 2: Los ratones tratados con AP desarrollan colitis menos grave después del tratamiento con TNBS o DSS

Materiales y métodos:

Diseño experimental:

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes. Para el primer experimento con DSS se obtuvieron 42 ratones C57BL/6 de tipo silvestre de ocho semanas de edad y para el experimento con TNBS se obtuvieron 20 ratones BALB/c de tipo silvestre de ocho semanas de edad de Charles River y Harlan Nederland (Horst, Países Bajos), respectivamente. Para un segundo experimento con DSS, se obtuvieron 72 ratones C57BL/6 de ocho semanas de edad de Charles River Nederland. Durante los experimentos, los ratones se alojaron en condiciones estándar y se les permitió libre acceso al agua y los alimentos.

En el primer experimento con ratones C57BL/6, la colitis se indujo por administración de dextran sulfato sódico (DSS) al 1,5 % (n = 18) o 2,5 % (n = 20) en el agua potable de los ratones durante una semana.

En los ratones BALB/c, la colitis se indujo por administración rectal en el día cero y siete de 1 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos) disuelto en etanol al 40 % en PBS mediante el uso de un catéter de vinilo que se colocó a tres centímetros del ano. Antes de la instilación, los ratones se anestesiaron mediante el uso de isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil-isofluranodifluorometiléter) (Abbott Laboratories Ltd., Queen-borough, Kent, Reino Unido) y después de la instilación los ratones se mantuvieron verticalmente durante 30 segundos. Después de 48 horas de la segunda administración de TNBS, los ratones se sacrificaron.

Durante la inducción de la colitis, diez ratones BALB/c y veinte C57BL/6 recibieron oralmente 100 unidades de fosfatasa alcalina disueltas en 100 µl de Tris 100 mM (pH 7,8) una vez al día; los otros ratones recibieron exclusivamente 100 µl de Tris 100 mM (pH 7,8). Cuatro ratones C57BL/6 se utilizaron como un control de referencia: no se indujo colitis ni recibieron ningún tratamiento.

Para un segundo experimento con DSS, se indujo colitis en ratones C57BL/6 (n = 48) por administración de DSS al 2 % en el agua potable durante 5 días. Veinticuatro de estos ratones recibieron 100 unidades de fosfatasa alcalina en 250 µl de Tris 100 mM (pH 7,8) una vez al día a partir del día 5 hasta el día 14, mientras que los otros 24 ratones recibieron vehículo solo. Un grupo de 24 ratones que recibieron agua potable normal y vehículo sólo, sirvió como control de referencia. Esta configuración se utilizó para investigar el uso de AP como un medicamento de rescate, una vez que se establece la colitis.

En todos los experimentos, el peso y la temperatura de los ratones se registraron diariamente. Después de sacrificar los ratones, se extrajeron el nódulo linfático caudal (CLN) y el colon de los ratones. A través de una incisión en la línea media, el colon se retiró y se abrió longitudinalmente. Después de retirar el material fecal, se midió el peso del colon y se utilizó como indicador del engrosamiento intestinal relacionado con la enfermedad. El colon se dividió en dos partes, una de las cuales se utilizó para el análisis histológico y la otra para la detección de citocinas.

Análisis histológico:

El colon dividido longitudinalmente se fijó en formaldehído al 4 %, se embebió en parafina para una histología de rutina. Tres cortes transversales (5 µm), tomados de cada muestra de colon, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se examinaron mediante microscopía óptica. La inflamación del colon se evaluó a ciegas mediante la estimación de 1) el porcentaje de área afectada, 2) la cantidad de folículos, 3) edema, 4) fibrosis, 5) erosión/ulceración, 6) pérdida de criptas y 7) infiltración de granulocitos y 8) monocitos con una puntuación máxima de 26.

El porcentaje de área afectada y la pérdida de criptas se clasificaron mediante una escala que está en el intervalo de 0 a 4 de la siguiente manera: 0, normal; 1, menos del 10 %; 2, 10 %; 3, 10 a 50 %; 4, más del 50 %. Los agregados foliculares se contaron y se clasificaron de la siguiente manera: 0 punto, 0-1 folículos; 1 punto, 2-3 folículos; 2 puntos, 4-5 folículos; 3 puntos, más de 6 folículos. Las erosiones se definieron como 0 si el epitelio estaba intacto, 1 para la ulceración que involucraba la lámina propia, 2 ulceraciones que involucraban la submucosa, y 3 cuando las ulceraciones eran transmurales. La gravedad de los otros parámetros se clasificó en una escala de 0 a 3 de la siguiente manera: 0, ausente; 1, débil; 2, moderada; 3, grave.

Cultivo de células:

Las células del nódulo linfático caudal de ratones con TNBS se aislaron al pasar el ganglio linfático a través de filtros de células de 40 µm (Becton/Dickson Labware, New Jersey, Estados Unidos). Los linfocitos aislados se suspendieron en 4 ml de medio RPMI 1640, que incluye L-glutamina, 10 % de suero fetal de ternero (FCS) y antibióticos (penicilina G sódica 10000 U/ml, sulfato de estreptomina 25 µg/ml, anfotericina B 25 µg/ml; Gibco/BRL, Paisley, Escocia). Las células se contaron y se añadieron a placas de 96 pocillos de fondo plano a 2 x 10⁵ células por pocillo en un volumen total de 200 µl del mismo medio. Las células se cultivaron en presencia de α-CD3 inmovilizado (concentración 1:30, clon 145.2C11) y α-CD28 soluble (concentración 1:1000, PharMingen) durante 48 horas a 37 °C. El sobrenadante se recogió y se utilizó para un ensayo de perlas para citocinas (CBA).

Homogeneización y determinación enzimática

- 5 Las láminas suizas de las muestras de colon que se tomaron 6 cm desde el ano se congelaron en el nitrógeno. Los homogenados se obtuvieron con un homogeneizador de tejidos en 9 volúmenes de tampón de lisis Greenberger (NaCl a 300 mmol/l, Tris a 15 mmol/l, MgCl₂ a 2 mmol/l, Triton X-100 a 2 mmol/l (Sigma, St. Louis, MO) Pepstatina A, Leupeptina, Aprotinina (Roche, Mannheim, Alemania), todas a 20 ng/ml, pH 7,4). El tejido se lisó durante una hora sobre hielo y se centrifugó durante 7 minutos a 3000 rpm y durante 10 minutos a 14 000 rpm. El sobrenadante se recogió y se almacenó congelado hasta el día de la determinación enzimática y el análisis de matriz de cuentas para citocinas de BD.
- 10 Las heces de los ratones se recogieron durante el período de colitis. El peso de las heces se registró y se suspendieron en 0,6 ml de tampón de glicina 50 mM con MgCl₂ 0,5 mM (pH = 9,6 a 25 °C). Después de la centrifugación (10', 13 000 rpm), el sobrenadante se almacenó congelado hasta el día de la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina.
- 15 La actividad de la fosfatasa alcalina en el colon y las heces se midió mediante espectrofotometría, con el uso de fosfato de p-nitrofenilo como sustrato en tampón de glicina 50 mM con MgCl₂ 0,5 mM (pH = 9,6 a 25 °C). La actividad enzimática se expresó en mU/ml para los homogenados de colon y en mU/mg para las heces.

Ensayo de perlas para citocinas (CBA)

- 20 Se realizó un ensayo de perlas para citocinas para determinar simultáneamente la producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5 en los homogenados de colon y el sobrenadante del cultivo de células CLN de acuerdo con las recomendaciones del fabricante de Becton Dickinson (BD) y como se describe en otra parte (37, ver la figura 2.2). Brevemente, las partículas (perlas de poliestireno) se tiñeron para cinco intensidades de fluorescencia. El colorante patentado tenía una longitud de onda de emisión de ~ 650 nm (FL-3). Cada partícula se acopló a través de un enlace covalente basado en la química de tiol-maleimida con un anticuerpo contra una de las cinco citocinas y representó una población discreta, única en su intensidad de FL-3. Las partículas con Ac sirvieron como captura para una citocina dada en el panel de inmunoensayo y pudieron detectarse simultáneamente en una mezcla. Las citocinas capturadas se detectaron por medio de inmunoensayo directo mediante el uso de cinco anticuerpos diferentes acoplados a ficoeritrina (PE), que emitió a ~ 585 nm (FL-2). Los patrones que están en el intervalo de 0 a 2000 pg/ml eran mezclas de las cinco citocinas, de manera que se obtuvieron cinco curvas patrón. Para cada muestra y mezcla patrón de citocinas, 10 μ l del reactivo Ac-perla de captura, de las muestras o del reactivo Ac-PE de detección se incubaron durante tres horas y se lavaron para eliminar el reactivo Ac-PE de detección no unido antes de la adquisición de datos mediante el uso de citometría de flujo. El análisis por citometría de flujo de dos colores se realizó mediante el uso de un citómetro de flujo FACScan® (Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS), San José, CA). Los datos se adquirieron y analizaron mediante el uso del programa informático Cytometric Bead Array (CBA) de Becton Dickinson.
- 35

Análisis Estadístico

- 40 Todos los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar. Donde se indica, se utilizó una prueba t de Student para calcular la significación estadística para la diferencia en una medición particular entre los diferentes grupos. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos (* $p < 0,05$).

Resultados

- 45 Para investigar si la AP oral tiene potencial terapéutico en la EII, se utilizaron como modelos la colitis inducida por TNBS y DSS en ratones. Tal como se predijo, la instilación intrarrectal de TNBS y la administración oral de DSS dieron como resultado diarrea y emaciación. En el día dos, murieron dos de los diez ratones en cada uno de los dos grupos de tratamiento (ver las figuras 2 y 3) lo que indicó que la AP no previene la mortalidad debido a la respuesta inflamatoria temprana. Dos o tres días después de la administración intrarrectal inicial de TNBS se activa una reacción reactiva hipersensible retardada de tipo 4 y provoca la mayor parte de la inflamación, lo que conduce a una mortalidad adicional. Aunque el tratamiento con AP no pudo evitar la muerte de los ratones durante esta primera reacción, evitó muertes adicionales debido a la respuesta inflamatoria secundaria.
- 50
- 55 En los grupos que recibieron DSS al 2 % en su agua potable durante 5 días con posterior administración de AP por sonda gástrica hasta 14 días, el 33 % de los ratones murieron entre el día 8 y 10 en el grupo tratado con AP. Después de eso ningún ratón murió en este grupo. Sin embargo, en el grupo tratado con placebo, en total 60 % de los ratones murieron a partir del día 8 hasta el día 14. Similar al modelo con TNBS, la AP es capaz de reducir la mortalidad en la etapa posterior de colitis por DSS, pero no en la fase de inducción.
- 60 Después de la primera administración de TNBS, el peso de los ratones había disminuido en el primer día tanto en los ratones tratados con AP como en los ratones control (ver la figura 4). Sin embargo, el peso de los ratones control se redujo hasta el 92 % de su peso inicial en el día cuatro, mientras que el peso de los ratones tratados con AP se incrementó hasta más del 98 % de su peso inicial y se estabilizó. En el sexto día, los ratones control también alcanzaron su peso inicial. Por lo tanto los efectos sobre el peso están casi sincronizados con los beneficios descritos para la supervivencia.
- 65

En los estudios con DSS, sólo el segundo grupo que recibió DSS al 2 % y se siguió hasta los 14 días mostró diferencias estadísticamente significativas en los días 10, 11 y 12 (figura 5). Los otros dos grupos se siguieron sólo hasta el día 7 y mostraron, como el primer grupo, que no hay diferencia entre los grupos tratados AP y no tratados hasta ese día (datos no mostrados).

Ejemplo 3, La producción de citocinas y la actividad de AP disminuyeron en el colon de ratones tratados con AP

Los homogenados de colon de ratones con TNBS y DSS se analizaron para la producción de citocinas mediante un ensayo de perlas para citocinas para investigar la magnitud de la respuesta Th1. En contraste con el aumento de la producción de citocinas en el CLN de ratones tratados con AP, la producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5 disminuyó en los homogenados de colon de estos ratones en comparación con los ratones control, pero no significativamente (ver la tabla 1). Los ratones con colitis inducida por DSS al 2,5 % confirman resultados similares, aunque estos resultados tampoco alcanzaron significación estadística. (Datos no mostrados).

Tabla 1, Concentraciones de citocinas en homogenados de colon medidas mediante CBA

	Ratones con TNBS control	Ratones con TNBS tratados con AP
TNF- α	19,7 \pm 12,4	10,8 \pm 10,8
IFN- γ	8,2 \pm 5,5	4,0 \pm 4,6
IL-2	4,4 \pm 2,9	2,7 \pm 2,6
IL-4	15,0 \pm 7,0	8,9 \pm 7,5
IL-5	5,9 \pm 4,0	2,9 \pm 3,8
	Ratones con DSS al 1,5 % control	Ratones con DSS al 1,5 % tratados con AP
TNF- α	15,6 \pm 5,1	13,1 \pm 5,4
IFN- γ	100,5 \pm 82,3	28,4 \pm 19,8
	Ratones con DSS al 2,5 % control	Ratones con DSS al 2,5 % tratados con AP
TNF- α	89,3 \pm 122,3	60,7 \pm 40,8
IFN- γ	130,0 \pm 85,5	83,2 \pm 90,0
IL-2	13,2 \pm 25,8	7,2 \pm 6,0
IL-4	23,4 \pm 42,5	24,7 \pm 19,2

La producción de IL-2, -4 y -5 en los ratones con DSS al 1,5 % fueron casi indetectables (datos no mostrados). La producción de TNF- α se redujo en los ratones tratados con AP en comparación con los ratones control con DSS, aunque no significativamente (ver la figura 7). En el caso de la producción de IFN- γ , las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$): la producción de IFN- γ disminuyó de 100,5 \pm 82,3 pg/ml en ratones control con DSS a 31,6 \pm 21,3 pg/ml en ratones tratados con AP.

Ejemplo 4, Ensayo farmacocinético de dosis oral única de BIAP en ratones

Materiales y Métodos

El objeto de la investigación fue la biodisponibilidad local y sistémica después de una aplicación única de una dosis alta de BIAP (fosfatasa alcalina intestinal bovina) por vía oral. El material de prueba se suministró como una solución y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Las diluciones de dosificación en agua potable esterilizada en autoclave se prepararon el mismo día del tratamiento. Se utilizó agua potable esterilizada en autoclave como solución de control.

El ratón negro/6 es una especie de roedor adecuada para la colitis inducida por DSS y es aceptable para las autoridades reguladoras para las pruebas de seguridad. La vía de administración oral corresponde al uso terapéutico que se pretende en seres humanos.

La sala de estudio y las jaulas se limpiaron y desinfectaron. Durante el estudio, la sala y las jaulas se limpiaron a intervalos regulares. La temperatura ambiente se ajustó a 22 \pm 3 °C y la humedad relativa se mantuvo entre 30 % y 70 %. Estos parámetros se controlaron diariamente. La luz artificial se ajustó a un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con luz a las 6:00 a.m. El aire se cambió aproximadamente 8 veces por hora en la sala de los animales y se filtró adecuadamente. Los animales se alimentaron ad libitum con granulados con SDS D3, analizados por el proveedor para nutrientes y contaminantes. El agua potable esterilizada en autoclave estaba disponible continuamente ad libitum a través de botellas para beber. El consumo se controla visualmente de manera diaria.

Tabla 2. Los grupos experimentales y el pretratamiento con DSS se asignaron de acuerdo con la siguiente tabla:

Grupo	Tratamiento	Núm. de animales	Etiquetado de tarjeta	Conc. en agua potable	Volumen [ml/kg de peso corporal]
Rojo	DSS	29	A - E (rojo)	2 %	Ver la Tabla 3
verde	-	29	A - E (verde)	-	Ver la Tabla 3

Tabla 3. Los grupos experimentales y el tratamiento con BIAP se asignaron de acuerdo con la siguiente tabla:

Grupo	De la jaula	Tratamiento	Núm. de animales	Conc. en agua potable	Volumen [ml/kg de peso corporal]	Sacr. Tiempo (min)
Control A	A verde	Placebo	5	-	12.5	150
Control B	B verde	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	10
Control C	B verde	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	30
Control D	C verde	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	60
Control E	C verde	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	90
Control F	D verde	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	120
Control G	D verde	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	180
Control H	E verde	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	240
Control I	E verde	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	360
DSS A	A rojo	Placebo	5	-	12.5	150
DSS B	B rojo	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	10
DSS C	B rojo	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	30
DSS D	C rojo	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	60
DSS E	C rojo	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	90
DSS F	D rojo	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	120
DSS G	D rojo	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	180
DSS H	E rojo	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	240
DSS I	E rojo	BIAP	3	6000 U/ml	12.5	360

De acuerdo con la Tabla 3, todos los ratones excepto aquellos en los grupos placebo en ambos grupos control y tratados con DSS recibieron una dosis oral única de 75 000 U/kg de BIAP por sonda gástrica oral (en 250 µl de agua potable esterilizada en autoclave). Los grupos placebo (n = 5) recibieron sólo 250 µl de agua potable esterilizada en autoclave. Todos los animales se trataron una sola vez. Antes del tratamiento con BIAP, algunos de los animales se trataron con DSS de acuerdo la Tabla 2.

Después de la extracción de sangre, los intestinos del animal se prepararon y se recolectaron heces de cada tercera parte del intestino delgado y del colon por separado. Cada muestra se disolvió mediante agitación vigorosa en 1 ml de tampón de glicina (25 mM, pH = 9,6)

Estas muestras se analizaron para determinar el contenido de fosfatasa alcalina mediante el uso de un ensayo para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina. El fosfato de paranitrofenilo, que es incoloro, se hidroliza por la fosfatasa alcalina a pH 9,6 y 25 °C para formar paranitrofenol libre, que es de color amarillo. La reacción puede seguirse espectrofotométricamente. El cambio en la densidad óptica a 405 nm por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la fosfatasa alcalina. La cantidad de enzima que provoca la hidrólisis de un micromol de fosfato de paranitrofenilo por minuto a pH 9,6 y 25 °C se define como una unidad. La cantidad de unidades presentes en una muestra puede calcularse o calibrarse contra una curva de muestras de AP con una concentración de AP conocida.

Resultados

Durante la fase de pretratamiento con DSS, los ratones se pesaron diariamente como una indicación para el desarrollo de colitis. La pérdida de peso de aproximadamente 10 % en comparación con los ratones control se usa para identificar la colitis inducida por DSS. En el día 6, los ratones que se trataron durante 5 días con DSS habían perdido alrededor del 10 % de peso corporal (figura 8) y se usaron en el experimento farmacocinético para identificar la biodisponibilidad local y sistémica de la BIAP administrada durante la colitis. Un día después, se usaron ratones control de la misma manera.

Para analizar la captación de DSS, las botellas de beber se pesaron diariamente antes y después del rellenado de las botellas. Los primeros tres días, los animales tratados con DSS consumieron aproximadamente la misma cantidad de agua que los animales control. Posteriormente, los ratones con DSS bebieron menos, probablemente como resultado de

la disminución del bienestar. Sin embargo, la ingesta diaria de DSS fue de aproximadamente 40 mg/ratón, que demostró ser suficiente para la inducción de colitis en otros experimentos (ver la figura 9).

5 El objetivo de este estudio fue analizar la biodisponibilidad local en el tracto intestinal. Para este propósito, los ratones se sacrificaron en diferentes puntos de tiempo y se aisló el tracto intestinal desde el duodeno hasta el colon. El intestino delgado (incluido el duodeno) se dividió en dos tres partes iguales. Se extrajeron heces de cada parte y del colon y se midió la actividad de la fosfatasa alcalina. En la figura 10, se muestra la actividad de la fosfatasa alcalina en las diferentes partes del intestino en diferentes puntos de tiempo. No se pudo medir la fosfatasa alcalina en ningún punto de tiempo en el duodeno y en la parte proximal del yeyuno. Esto se debió probablemente al hecho de que el paso a través de esta parte tiene lugar en cuestión de 10 minutos, el primer punto de muestreo. A los 10 minutos tanto los animales control como con DSS tienen niveles máximos de fosfatasa alcalina en la parte distal del yeyuno y la parte proximal del íleon. Entre media hora y una hora, se producen valores máximos de AP en la parte distal del íleon. En el colon, la fosfatasa alcalina se incrementa una hora y media después de la sonda gástrica y después de seis horas, la mayor parte de la fosfatasa alcalina se excretó o se descompuso.

15 Considerando que se administró un total de 1350 U por ratón, se estima una biodisponibilidad local en la parte distal del íleon y el colon a $200/1350 = 15 \%$ y $80/1350 = 6 \%$, respectivamente. Sin embargo, estos valores son probablemente una subestimación, ya que se basan en valores máximos medios de 3 ratones individuales cada uno (ver el análisis).

20 El objetivo de este estudio fue estimar la biodisponibilidad local de BIAP después de la administración de una dosis alta oral. La biodisponibilidad local se estimó en 15 % en la parte distal del íleon y 6 % en el colon. Estos valores están probablemente subestimados, debido a que los valores son de ratones individuales en un punto de tiempo dado y no representan la actividad de la fosfatasa alcalina a través del tracto de un ratón seguido en el tiempo. Como consecuencia, pueden faltar valores máximos en ratones individuales en una parte dada del intestino en un punto de tiempo dado. Sin embargo, los resultados como se muestra en la figura 10 demuestran claramente la biodisponibilidad local de AP tras la administración oral. Estos resultados ponen de relieve la viabilidad del método de la presente invención para administrar a un sujeto una fuente de fosfatasa alcalina para prevenir o reducir el influjo de LPS (tóxico) a través de un revestimiento mucosal de una cavidad corporal de mamífero.

30 Figuras

La Figura 1 explica el modelo de la presente invención en tres etapas, 1. Mucosa en una condición sana, con histoquímica de AP normal y desintoxicación de LPS. 2. Condición patológica, tinción de AP deficiente, insuficiente desintoxicación de LPS por AP, influjo/translocación de LPS tóxico desde el intestino hacia la circulación, lo que conduce a una respuesta inflamatoria 3. Restauración de los niveles de AP de la mucosa y desintoxicación de LPS al proporcionar una fuente exógena de AP.

35 Figura 2, Tasa de letalidad en ratones con colitis inducida por TNBS

Figura 3, Tasa de letalidad en ratones con colitis inducida por DSS

40 Figura 4, Pérdida de peso en ratones tratados con AP y no tratados, con colitis inducida por TNBS.

Figura 5, Pérdida de peso en animales tratados con AP y no tratados, con colitis inducida por DSS

Figura 6, Producción de citocinas en el colon de ratones con colitis por TNBS.

a. La respuesta TH1 en el colon

b. La respuesta TH2 en el colon

45 Figura 7, La concentración de a. TNF- α y b. IFN- γ en homogenados de colon. Los ratones control tienen valores normales de ratones no enfermos y no tratados.

Figura 8, el tratamiento con DSS disminuye el peso corporal. Los ratones se trataron con agua potable normal o con agua potable que contenía DSS al 2 % durante 5 días. En el día seis, los animales tratados con DSS habían perdido alrededor del 10 % de peso corporal en comparación con los animales control y se definieron como "colíticos". Se muestran las medias con las desviaciones estándar de 29 animales por grupo.

50 Figura 9, los ratones tratados con DSS consumen entre 40-80 mg de DSS por día. Los ratones se trataron con agua potable o agua potable que contenía DSS al 2 %.

Las botellas de bebida se pesaron antes y después de rellenar. Los valores muestran la ingesta media de agua en g/ratón/día.

55 Figura 10, Niveles de fosfatasa alcalina en diferentes partes del tracto intestinal en diferentes puntos de tiempo después de la sonda gástrica. En diferentes puntos de tiempo después de la sonda gástrica, los ratones se sacrificaron y los intestinos se extrajeron. Se recogieron heces de diferentes partes del tracto y se midió el contenido de fosfatasa alcalina. Se muestran valores de las medias de tres ratones por punto de tiempo.

60

Referencias:

- Alvaro D, Benedetti A, Marucci L, y otros. The function of alkaline phosphatase in the liver: regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. *Hepatology (United States)*, agosto 2000, 32(2) págs.174-84.
- 5 Anh DJ, Eden A, Farley JR. Quantitation of soluble and skeletal alkaline phosphatase, and insoluble alkaline phosphatase anchor-hydrolase activities in human serum. *Clin Chim Acta*. 2001 sept. 25; 311(2): 137-48.
- 10 Bentala H, Verweij WR, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock*. 2002 dic.; 18(6): 561-6.
- Bentala, H., Verweij, W.R., Brands, R, Huizinga-VanderVlag A, Meijer, DKF, Poelstra, K. Intravenous administration of alkaline Phosphatase to mice challenged with E.coli lipopolysaccharide has prominent protective effects. Submitted for publication.
- 15 Beumer C, Wulferink M, Raaben W, Fiechter D, Brands R, Seinen W. Calf intestinal alkaline phosphatase, a novel therapeutic drug for lipopolysaccharide (LPS)-mediated diseases, attenuates LPS toxicity in mice and piglets. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 nov; 307(2): 737-44.
- 20 Paul H. Davis and Samuel L. Stanley, Jr* *Cellular Microbiology* (2003) 5 (12), 849-860 Breaking the species barrier: use of SCID mouse-human chimeras for the study of human infectious diseases.
- Deng JT, Hoylaerts MF, De Broe ME, van Hoof VO. Hydrolysis of membrane-bound liver alkaline phosphatase by GPI-PLD requires bile salts. *Am J Physiol*. 1996 oct; 271(4 Pt 1): G655-63.
- 25 Eichbaum EB, Harris HW, Kane JP, Rapp JH. Chylomicrons can inhibit endotoxin activity in vitro. *J Surg Res*. 1991 nov; 51(5): 413-6.
- Ghermay AP, Brady S, Havel RJ, Harris HW, Rapp JH. Sepsis increases endocytosis of endotoxin into hepatocytes. *Surgery*. 1996 ago; 120(2): 389-93; discussion 393-4.
- 30 Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* Author: Joel G. Hardman, Joel G. Hardman, Lee E. Limbird, Alfred Goodman Gilman, 13 agosto, 2001 Manufacturer: McGraw-Hill Professional ISBN: 0071354697.
- 35 Harris HW, Brady SE, Rapp JH. Hepatic endosomal trafficking of lipoprotein-bound endotoxin in rats. *J Surg Res*. 2002 jul; 106(1): 188-95.
- Harris HW, Eichbaum EB, Kane JP, Rapp JH. Detection of endotoxin in triglyceride-rich lipoproteins in vitro. *J Lab Clin Med*. 1991 ago; 118(2): 186-93.
- 40 Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest*. 1990 sept; 86(3): 696-702.
- Harris WS, Hustvedt BE, Hagen E, Green MH, Lu G, Drevon CA. N-3 fatty acids and chylomicron metabolism in the rat. *J Lipid Res*. 1997 Mar; 38(3): 503-15.
- 45 Harris HW, Rockey DC, Chau P. Chylomicrons alter the hepatic distribution and cellular response to endotoxin in rats. *Hepatology*. 1998 May; 27(5): 1341-8.
- 50 Harris WS. Chylomicron metabolism and omega 3 and omega 6 fatty acids. *World RevNutr Diet*. 1994; 76: 23-5.
- Harris WS. omega 3 fatty acids and human chylomicron metabolism. *World RevNutr Diet*. 2001; 88: 163-7.
- Harris HW, Kasravi FB. Lipoprotein-bound LPS induces cytokine tolerance in hepatocytes. *J Endotoxin Res*. 2003; 9(1): 45-50.
- 55 Harris WS, Muzio F. Fish oil reduces postprandial triglyceride concentrations without accelerating lipid-emulsion removal rates. *Am J ClinNutr*. 1993 jul; 58(1): 68-74.
- 60 Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Read TE, Kane JP, Jones AL, Eichbaum EB, Bland GF, Rapp JH. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J Clin Invest*. 1993 mar; 91(3): 1028-34.
- 65 Kasravi FB, Brecht WJ, Weisgraber KH, Harris HW. Induction of cytokine tolerance requires internalization of Chylomicron-Bound LPS into hepatocytes. *J Surg Res*. 2003 dic.; 115(2): 303-9.

- Kasravi FB, Welch WJ, Peters-Lideu CA, Weisgraber KH, Harris HW. Induction of cytokine tolerance in rodent hepatocytes by chylomicron-bound LPS is low-density lipoprotein receptor dependent. *Shock*. 2003 feb; 19(2): 157-62.
- 5 Michele M. Kosiewicz, Cynthia C. Nast, Anasuya Krishnan, Jesus Rivera-Nieves, Christopher A. Moskaluk, Satoshi Matsumoto, Kosuke Kozaiwa, y Fabio Cominelli, Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, marzo 2001, Volumen 107, número 6.
- 10 Masaya Kobayashi, Mi-Na Kweon, Hirotaka Kuwata, Robert D. Schreiber, Hiroshi Kiyono, Kiyoshi Takeda, y Shizuo Akira. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice *J. Clin. Invest.* 111:1297-1308 (2003).
- Kumwenda ZL, Wong CB, Johnson JA, Gosnell JE, Welch WJ, Harris HW. Chylomicron-bound endotoxin selectively inhibits NF-kappaB activation in rat hepatocytes. *Shock*. 2002 ago; 18(2): 182-8.
- 15 J Lindsay, C van Montfrans, F Brennanl, S van Deventer, P Drillenbug, H Hodgson4, A te Velde y M Sol Rodriguez Pena, IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis *Gene Therapy* (2002) 9, 1715-1721.
- 20 Locati M, Riboldi E, Bonecchi R, Transidico P, Bernasconi S, Haribabu B, Morris AJ, Mantovani A, Sozzani S. Selective induction of phospholipase D1 in pathogen-activated human monocytes. *Biochem J*. 2001 ago. 15; 358(Pt 1): 119-25.
- Nauli AM, Zheng S, Yang Q, Li R, Jandacek R, Tso P. Intestinal alkaline phosphatase release is not associated with chylomicron formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 abr; 284(4): G583-7. Epub 2002 dic. 4.
- 25 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. Related A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990 mar; 98(3): 694-702.
- Park Y, Harris WS. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res*. 2003 mar; 44(3): 455-63.
- 30 Park Y, Damron BD, Miles JM, Harris WS. Measurement of human chylomicron triglyceride clearance with a labeled commercial lipid emulsion. *Lipids*. 2001 Feb; 36(2): 115-20.
- Park Y, Grellner WJ, Harris WS, Miles JM. A new method for the study of chylomicron kinetics in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 dic; 279(6): E1258-63.
- 35 Poelstra, K., Bakker, W.W., Klok, P.A., Hardonk, M.J., Meijer, D.K.F. (1997) A physiological function for AP: endotoxin detoxification. *Laboratory Investigation* 76, 319-327.
- 40 Poelstra, K., Bakker, W.W., Klok, P.A., Kamps, J.A.A.M., Hardonk, M.J., Meijer, D.K.F. (1997) Dephosphorylation of endotoxin by AP in vivo. *American Journal of Pathology* 151, 1163-1169.
- Poelstra, K., W.W. Bakker, M.J.Hardonk y D.K.F. Meijer. (1994) Pharmaceutical composition comprising Phosphatase or a derivative thereof. *International patent application PCT/NL94/00189*.
- 45 Poelstra, K., D.K.F.Meijer, A.Manin't Veld (1998) The LPS-binding moiety of AP as a diagnostic tool in patients with sepsis. *International patent application no. PCT/NL98/00722*.
- Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Hardonk MJ, Meijer DK. A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification. *Lab Invest*. 1997 mar; 76(3): 319-27.
- 50 Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Kane JP, Rapp JH. The protective effect of serum lipoproteins against bacterial lipopolysaccharide. *Eur Heart J*. 1993 dic; 14 Suppl K: 125-9.
- 55 Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Calhoun MC, Kane JP, Rapp JH. Chylomicrons enhance endotoxin excretion in bile. *Infect Immun*. 1993 ago; 61(8): 3496-502.
- Rennick, D.M. y Fort, M.M., Lessons From Genetically Engineered Animal Models XII. IL-10-deficient (IL-10 -/-) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G829-G833, 2000.
- 60 Shao JS, Engle M, Xie Q, y otros. Effect of tissue non-specific alkaline phosphatase in maintenance of structure of murine colon and stomach. *Microsc Res Tech (United States)*, Oct 15 2000, 51(2) págs.121-8.
- 65 Warren Strober, Kazuhiko Nakamura, y Atsushi Kitani, The SAMP1/Yit mouse: another step closer to modeling human inflammatory bowel disease. *The Journal of Clinical Investigation* | March 2001 Volumen 107 | Número 6, 667-69

Xu Q, Lu Z, Zhang X A novel role of alkaline phosphatase in protection from immunological liver injury in mice. Liver (Denmark), feb 2002, 22(1) págs.8-14

Reivindicaciones

- 5 1. El uso de fosfatasa alcalina para la fabricación de un medicamento para administrar a una capa mucosal del tracto gastrointestinal para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal, en donde la enfermedad inflamatoria del tracto gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, enterocolitis y enterocolitis necrotizante.
- 10 2. El uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde la fosfatasa alcalina es para administración oral.
3. El uso de conformidad con cualquier reivindicación precedente, en donde la permeabilidad de la mucosa del tracto gastrointestinal para el LPS aumenta debido a una disminución de la perfusión o isquemia de los intestinos.
- 15 4. El uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde la fosfatasa alcalina es para administración tópica en una capa mucosa del tracto gastrointestinal.
- 20 5. Una composición que comprende fosfatasa alcalina, en donde la fosfatasa alcalina tiene un revestimiento entérico para la administración oral y el suministro a la mucosa intestinal.
6. La composición de conformidad con la reivindicación 5, en donde la fosfatasa alcalina es una fosfatasa alcalina intestinal de mamífero, fosfatasa alcalina sin especificidad tisular, fosfatasa alcalina placentaria o fosfatasa alcalina hepática.
- 25 7. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la fosfatasa alcalina es recombinante, humana o bovina.
8. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la composición es un producto alimenticio o nutracéutico enriquecido con fosfatasa alcalina, adecuado para la ingestión oral y el suministro de fosfatasa alcalina al revestimiento mucosal del tracto gastrointestinal.
- 30 9. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el producto alimenticio es un producto lácteo que comprende fosfatasa alcalina.
- 35 10. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde el producto lácteo es una fracción de leche o una leche no pasteurizada o parcialmente pasteurizada.
- 40 11. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la fracción de leche es la fracción de membrana de glóbulos de la leche.

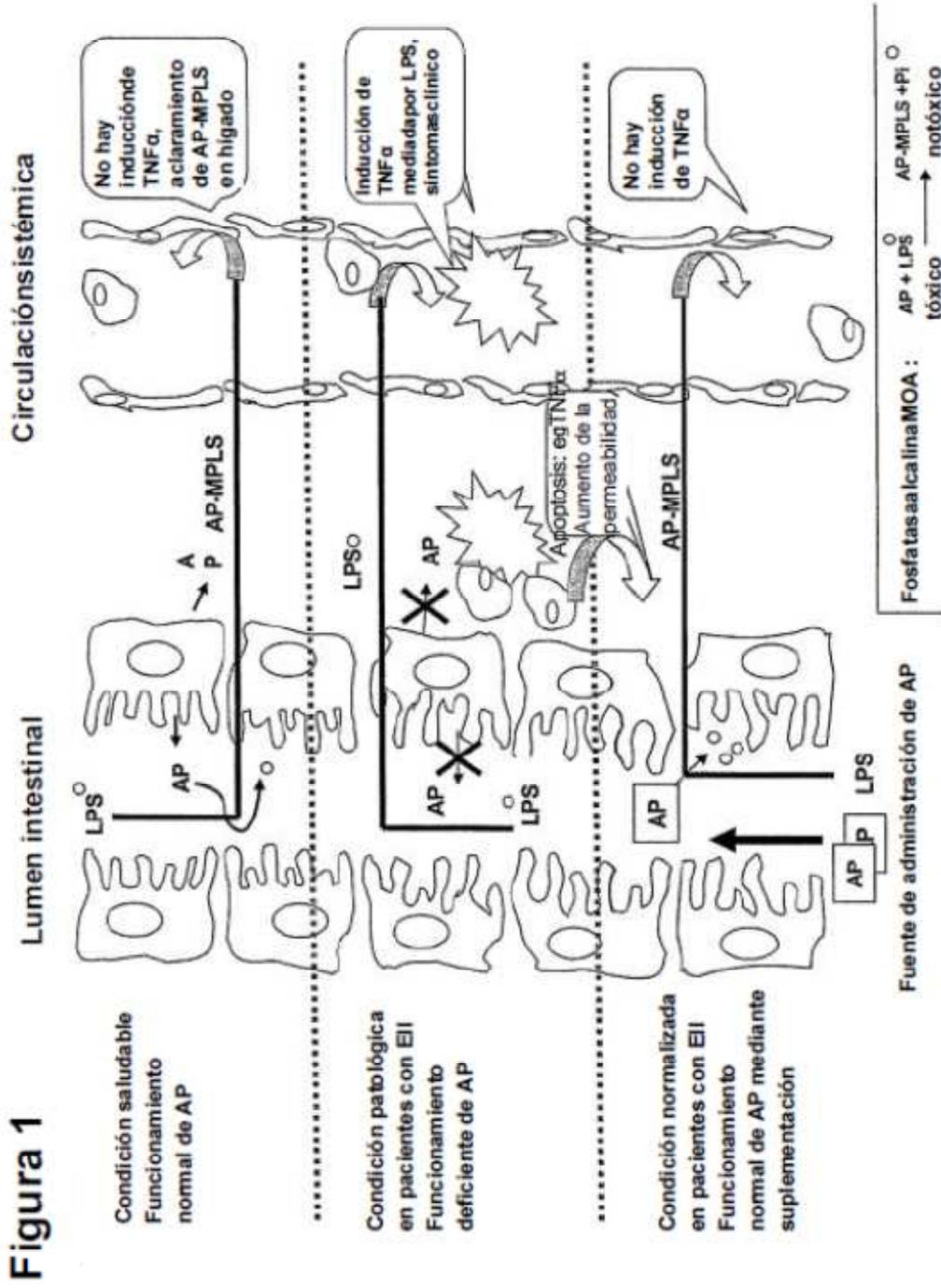


Figura 2

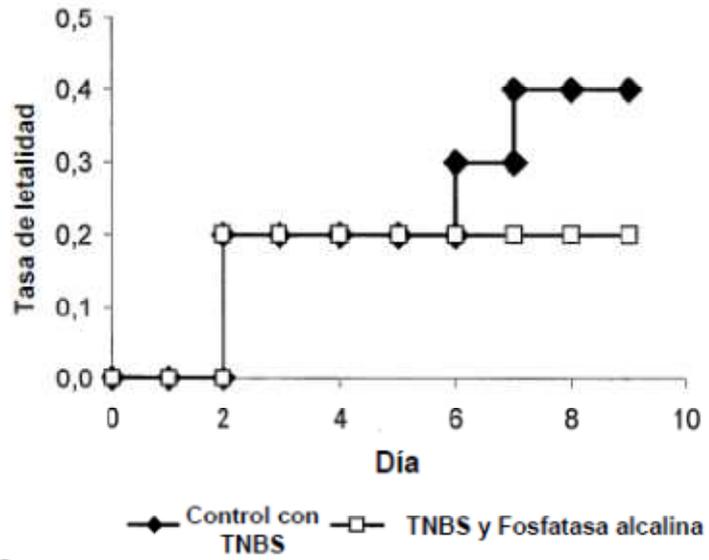


Figura 3

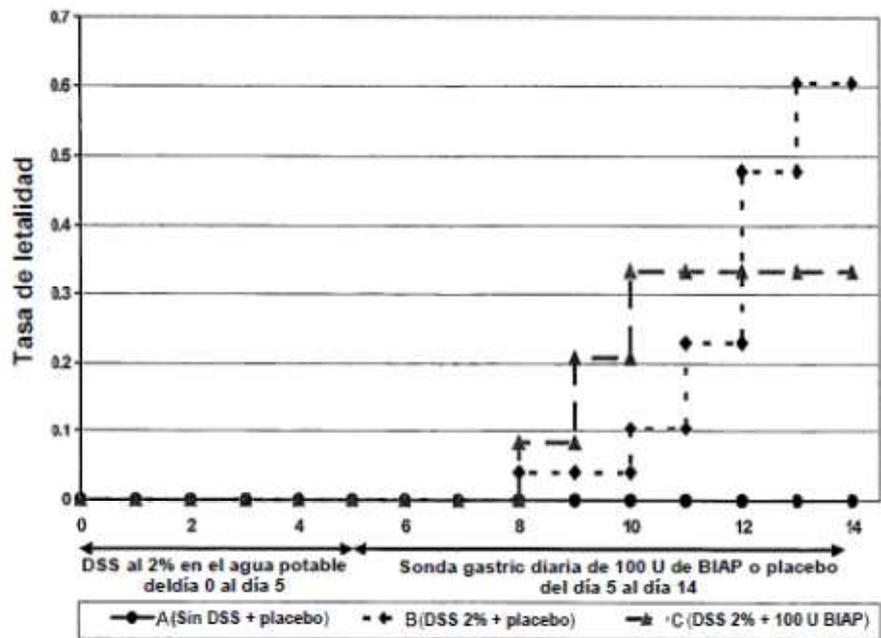


Figura 4

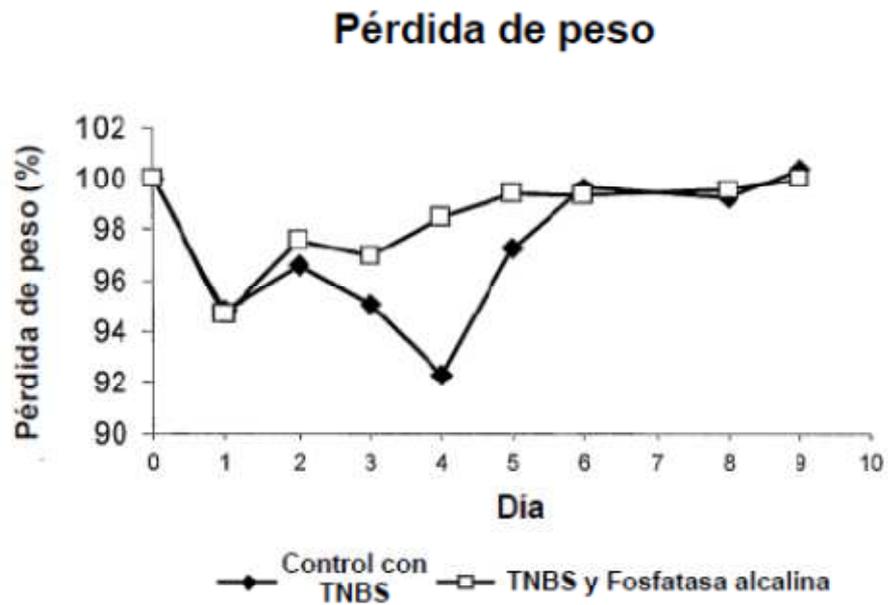


Figura 5

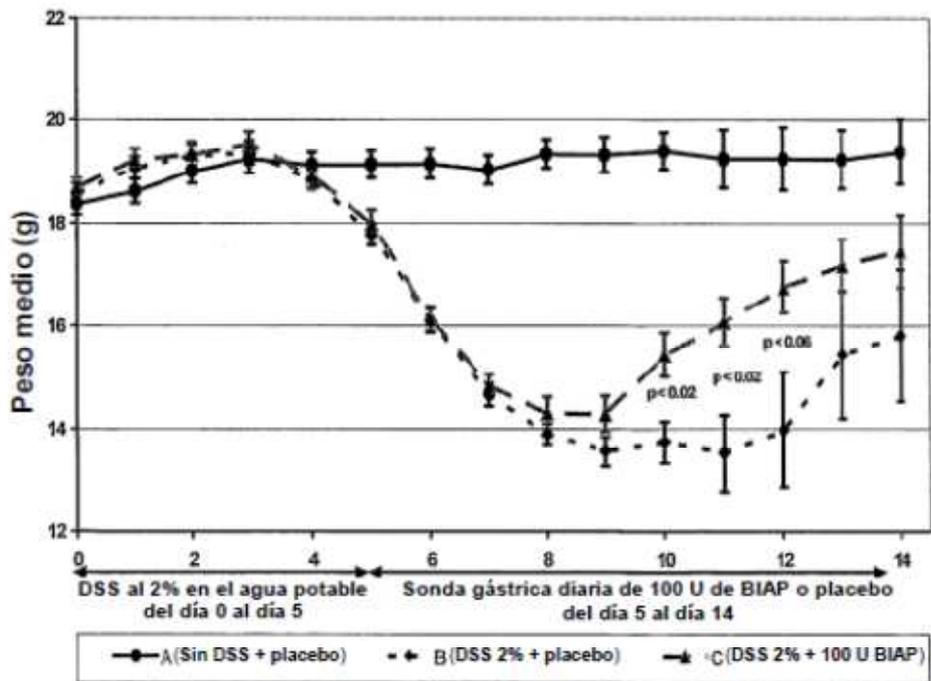


Figura 6a

Respuesta de TH1 en el colon

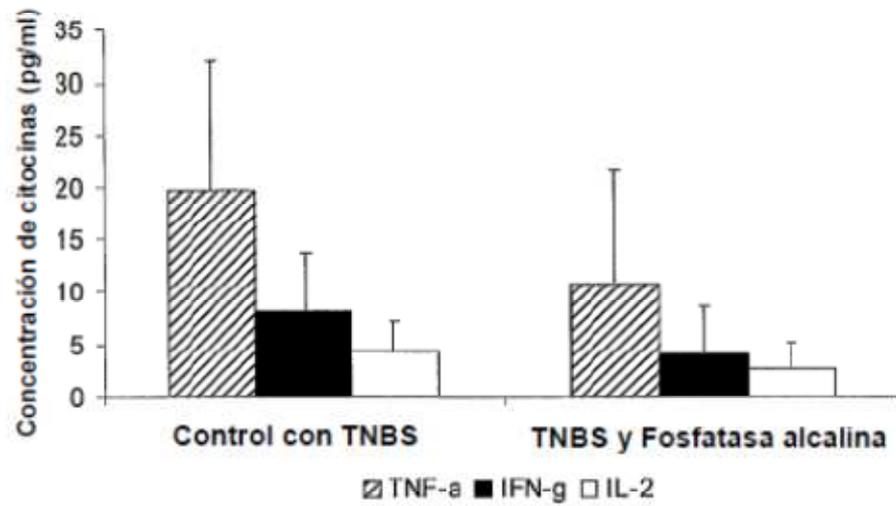


Figura 6b

Respuesta de TH2 en el colon

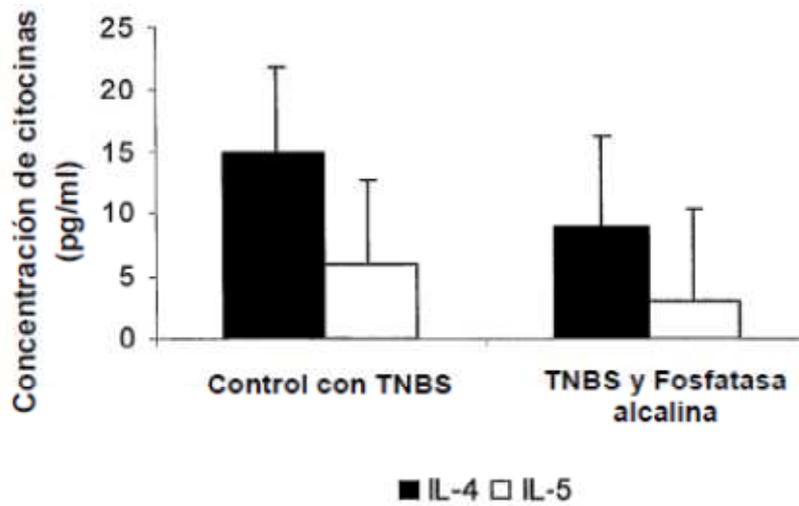


Figura 7a

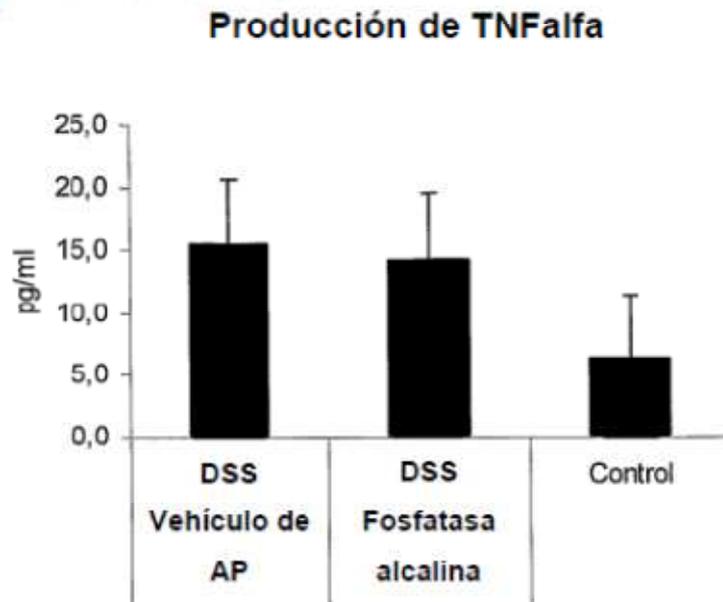


Figura 7b

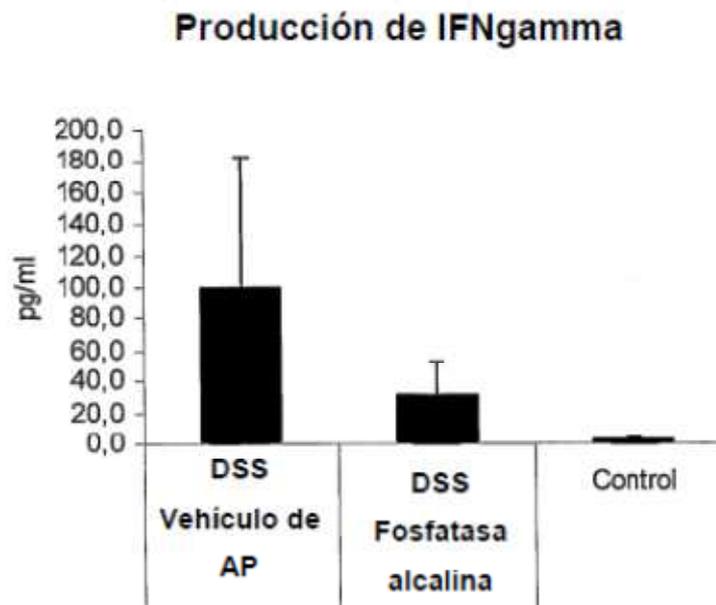


Figura 8

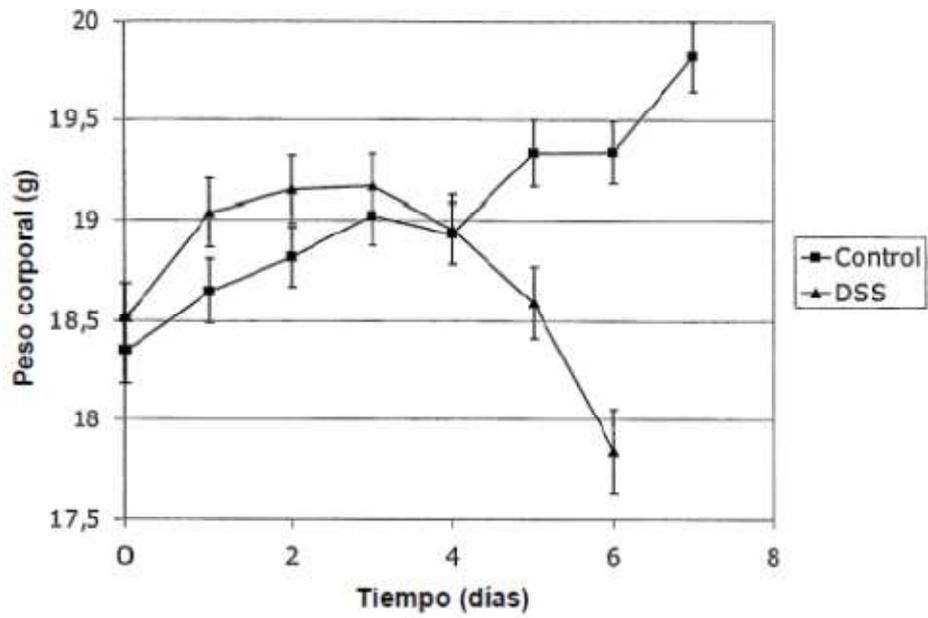


Figura9

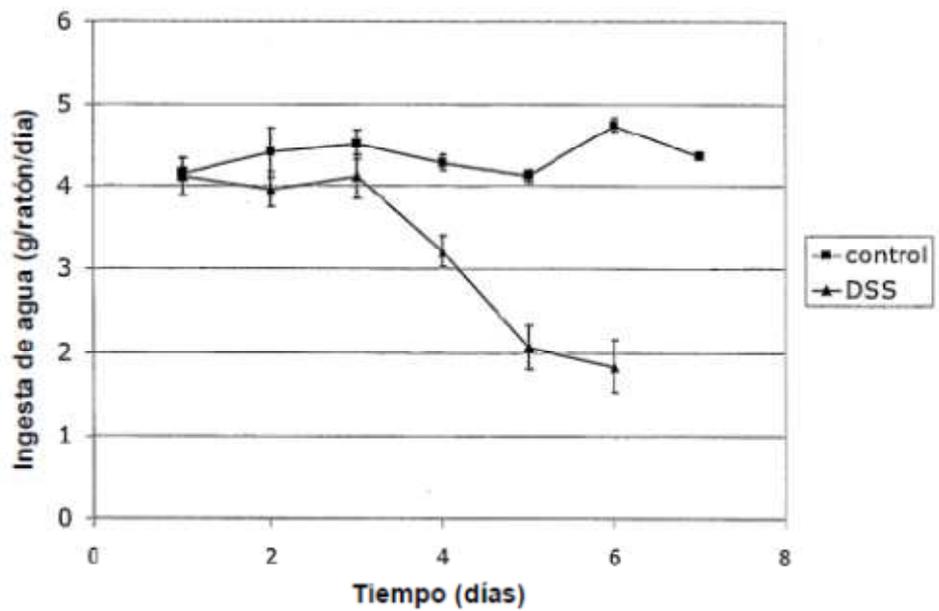


Figura10a

Duodeno + parte proximal del yeyuno

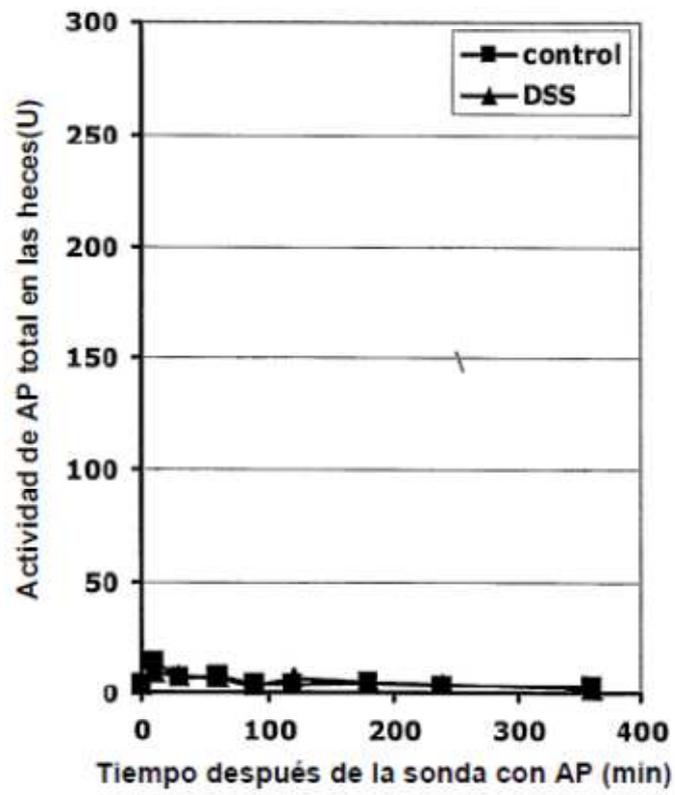


Figura10b

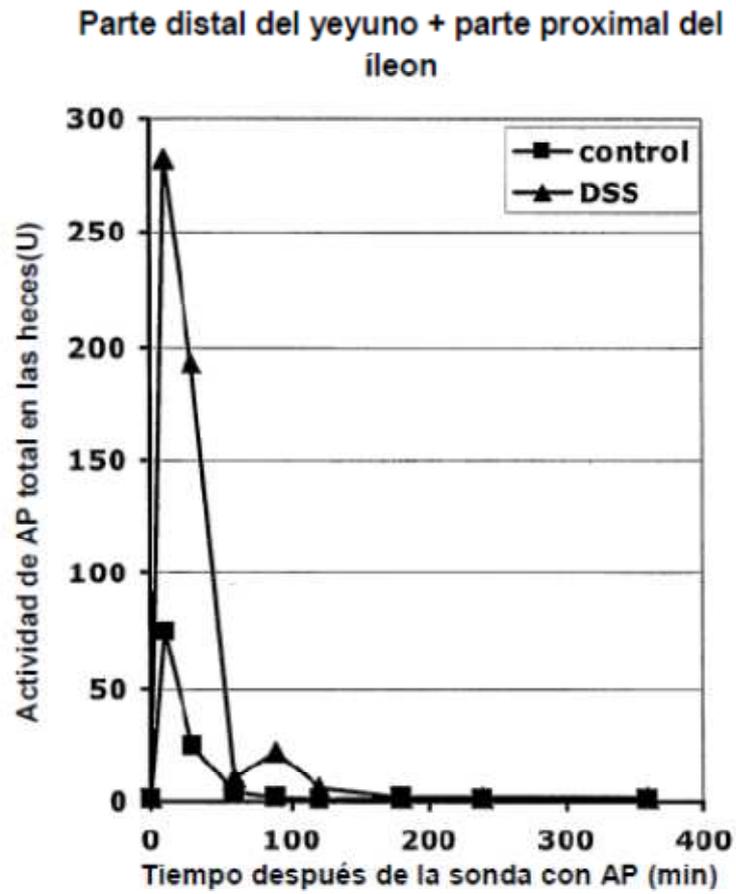


Figura 10c

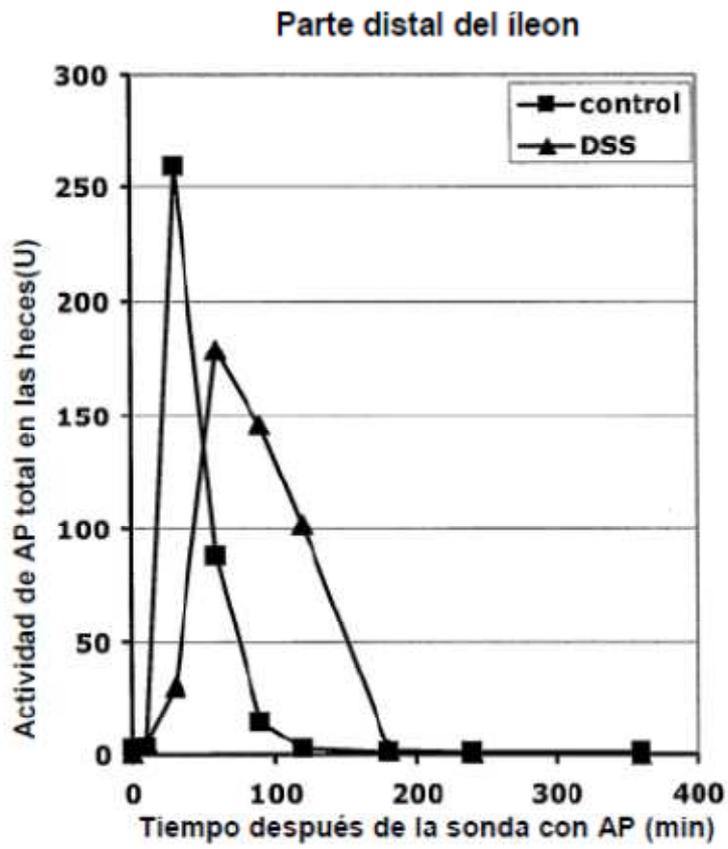


Figura 10d

