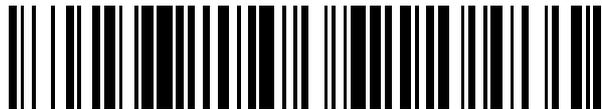


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 786**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7016 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2010 PCT/GB2010/050659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO10122344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010 E 10714956 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2421541**

54 Título: **Nuevo uso**

30 Prioridad:

23.04.2009 GB 0906983

27.11.2009 GB 0920784

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

06.11.2018

73 Titular/es:

CLASADO INC. (100.0%)

Edificio Interseco, Piso 2 Calle Elvira Mendez

Apartado 0816-01560

Panama, PA

72 Inventor/es:

TZORTZIS, GEORGIOS;

VULEVIC, JELENA y

ATTANASIO, FRANCESCO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 688 786 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

Nuevo uso

La presente invención se refiere al uso de un galactooligosacárido, en la prevención de la inflamación, en particular en la prevención de la inflamación intestinal. Los galactooligosacáridos son carbohidratos no digeribles, que son resistentes a las enzimas digestivas gastrointestinales de los mamíferos pero son fermentados por bacterias colónicas específicas.

La flora del intestino humano comprende géneros microbianos patógenos, benignos y beneficiosos. Una predominancia de los primeros puede conducir a trastornos intestinales que pueden ser tanto agudos (p.ej. gastroenteritis) como crónicos (p.ej. enfermedad inflamatoria del intestino y algunos cánceres intestinales).

Se ha demostrado que los prebióticos, que se definen como ingredientes de un alimento no digerible que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, dando como resultado de este modo una mejoría en la salud del huésped, tienen un efecto protector indirecto en varias afecciones inflamatorias, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Se ha encontrado en algunos pacientes de IBD que el sistema inmunitario adaptivo es hiper-responsivo a la flora intestinal comensal (véase Guarner F, Malagelada JR, Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., (2003); 17; 793-804). Como resultado, se han usado prebióticos para potenciar la microflora intestinal beneficiosa, lo que ha ayudado a prevenir una recaída en la enfermedad (véase Sartor RD., Gastroenterology, (2004), 126, 1620-1633).

Un grupo de compuestos que se clasifica como prebióticos son los galactooligosacáridos. Estos son oligosacáridos que contienen galactosa de la forma $\text{Glc } \beta 1-4 [\text{Gal } \beta 1-6]_n$, donde $n = 2-5$, y se producen a partir de jarabe de lactosa usando la actividad transgalactosilasa de la enzima β -galactosidasa (Crittenden, (1999) Probiotics: A Critical Review, Tannock, G. (ed) Horizon Scientific Press, Wymondham, págs. 141-156).

El documento EP 1 644 482 describe una nueva cepa de *Bifidobacterium bidifum* que produce una actividad de la enzima galactosidasa que convierte la lactosa en una nueva mezcla de galactooligosacáridos. Esta mezcla de galactooligosacáridos comprende disacáridos Gal (β 1-3) Glc; Gal (β 1-3)-Gal; Gal (β 1-6)-Gal; Gal (α 1-6)-Gal; trisacáridos Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc; o Gal (β 1-3)-Gal (β 1-4)-Glc; tetrasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc o pentasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc, y se ha demostrado que tiene propiedades prebióticas y que aumenta la población de las bacterias beneficiosas bifidobacteria y lactobacilli. Esta mezcla de galactooligosacáridos se comercializa en el mercado bajo el nombre Bimuno (Marca Registrada) y está disponible en Clasado Ltd (Milton Keynes, UK).

Vulevic, J et al describieron en Am. J Clin. Nutr., (2008), 88: 1438-46 cómo administrar galactooligosacáridos a personas mayores sanas dio efectos positivos tanto sobre la composición de la microflora fecal como la respuesta inmunitaria.

Se ha encontrado ahora que un galactooligosacárido que tiene un DP (grado de polimerización) de 3 o más puede modular directamente la respuesta inflamatoria de la mucosa intestinal de los mamíferos. En particular, atenúa la respuesta de las quimiocinas pro-inflamatorias, en presencia de agentes inflamatorios. Por tanto, tal galactooligosacárido puede ser útil en el tratamiento de afecciones inflamatorias intestinales tales como la enfermedad inflamatoria del intestino, colitis, colitis enteronecrotizante, colitis pseudomembranosa, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, diverticulitis, isquemia, etc.

Según la invención se proporciona un galactooligosacárido que tiene un DP de 3 o más, galactooligosacárido que se selecciona del grupo que consiste en trisacáridos Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc, Gal (β 1-3)-Gal (β 1-4)-Glc, tetrasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc, y pentasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc, para uso en la prevención de trastornos inflamatorios intestinales. Preferiblemente el galactooligosacárido tiene un DP de 3 a 5.

Los enterocitos forman una única capa epitelial polarizada que separa el entorno luminal del huésped. Son contribuyentes activos a la defensa del huésped. Su respuesta inmunitaria innata a cualquier estímulo inflamatorio es principalmente responsable de regenerar rápidamente la función de barrera del epitelio. El epitelio puede ser inducido a expresar citocinas proinflamatorias y quimiocinas que comienzan el proceso de reclutar células inmunitarias innatas tales como neutrófilos hacia la mucosa dañada, si fuera necesario. Por ejemplo, pueden ser estimuladas quimiocinas proinflamatorias, tales como IL-8, durante una respuesta inmunitaria por células epiteliales y por macrófagos para reclutar neutrófilos y PMNs (leucocitos polimorfonucleares) hacia la mucosa inflamada. La Proteína Inflamatoria de Macrófagos-3 α (MIP-3 α) o CCL20 es otra quimiocina que excita el sistema inmunitario adaptivo activando los linfocitos y células dendríticas mediante la activación del receptor de quimiocinas CCR6. La inducción de IL-8 y MIP-3 α (CCL20) indica el grado de respuesta a un desafío inflamatorio.

Se ha estudiado el efecto del galactooligosacárido sobre la respuesta inflamatoria de diferentes modelos de cultivos celulares colónicos de adultos. Se encontró, inesperadamente, que en concentraciones fisiológicas atenúa la respuesta de quimiocinas proinflamatorias inducida por un estímulo inflamatorio del TNF- α en las células epiteliales intestinales, es decir, enterocitos humanos.

El galactooligosacárido puede prepararse a partir de la mezcla de galactooligosacáridos disponible en el mercado conocida como Bimuno por purificación usando por ejemplo cromatografía de exclusión de tamaños usando por ejemplo una columna Biogel P2 mantenida a temperatura ambiente. La muestra puede prepararse disolviendo el polvo en agua al 10% en volumen y eluyendo a una velocidad de 2 ml/min con agua desionizada.

- 5 Alternativamente, la fracción activa de la mezcla Bimuno puede prepararse por transgalactosilación enzimática usando la enzima apropiada.

El galactooligosacárido puede presentarse como un polvo, un jarabe o en la forma de una pastilla blanda. Puede administrarse a un paciente que padece un trastorno inflamatorio, por ejemplo un trastorno inflamatorio intestinal, diariamente en una dosis eficaz del galactooligosacárido activo de 1 a 10 g, preferiblemente de 2 a 5 g, lo más preferiblemente 2,75 g. Este puede tomarse en una única dosis o en dos dosis independientes espaciadas varias horas. El polvo de galactooligosacárido puede añadirse a una bebida caliente o esparcido sobre comida. El jarabe puede ser consumido en sí mismo o mezclado alternativamente en una bebida o untado sobre comida. La pastilla blanda se mastica en la boca.

10 Para prevenir la inflamación, el galactooligosacárido puede administrarse a un individuo en una dosis diaria eficaz de 1 a 10 g, preferiblemente 2 a 5 g, lo más preferiblemente 2,75 g.

La presente invención será descrita adicionalmente a modo de referencia a los siguientes ejemplos y figuras.

La Figura 1 muestra el efecto de B-GOS sobre la secreción de IL-8 inducida por TNF- α en células T84;

Las Figuras 2(A) y (B) muestran el efecto de B-GOS sobre la secreción de IL-8 y MIP-3 α inducida por TNF- α en células NCM-460;

20 Las Figuras 3(A) y (B) muestran el efecto de B-GOS sobre la expresión de ARNm de IL-8 y MIP-3 α en células NCM-460 tratadas con TNF- α ;

Las Figuras 4(A), (B) y (C) muestran el efecto de B-GOS sobre la translocación de la proteína NF- κ B p65 en los núcleos de células NCM-460 tratadas con TNF- α ;

Las Figuras 5 y 6 muestran el efecto de B-GOS sobre la secreción de IL-8 inducida por TNF- α en células NCM-460;

25 Las Figuras 7(A) y (B) muestran el efecto de B-GOS sobre la secreción de IL-6 y MIP-2 en ratones tratados con DSS;

Las Figuras 8(A) y (B) muestran el efecto de diferentes fracciones de galactooligosacáridos sobre la producción de IL-8 y MIP-3 α respectivamente; y

30 Las Figuras 9(A) y (B) muestran el efecto sobre la producción de IL 8 y MIP 3 α inducida por TNF- α respectivamente, cuando se tratan células NCM460 con Bimuno y las fracciones DP3 y SP>3 del mismo.

Ejemplo 1

Efecto de los galactooligosacáridos sobre la secreción de citocinas

35 Se cultivaron células epiteliales intestinales a confluencia en placas de 24 pocillos a partir de una concentración inicial de 5×10^5 células/ml. Cuando las células alcanzaron 70% de confluencia, se trataron por cuadruplicado como sigue: (i) control negativo, (ii) control positivo de TNF- α (10 ng/ml), (iii) B-GOS (5 g/l) y (iv) TNF- α (10 ng/ml) con B-GOS (5 g/l). Se usó una concentración de 5 g/l de galactooligosacárido, dado que esta es la concentración fisiológica de los oligosacáridos encontrados en la leche humana. Después de 16 horas, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C para determinar la secreción de IL-8 y MIP-3 α más tarde por ELISA. En los experimentos que siguen, el TNF- α fue sustituido por IL1 β o flagelina.

40 Cuantificación de IL-8. La concentración de IL-8 se midió por ELISA como se describió previamente (Claud EC, Savidge T, Walker WA 2003 Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatr Res* 53:419-425). Brevemente, cada pocillo de una placa de alta unión de 96 pocillos (Nunc Immulon, Fisher Scientific, Middletown, VA, EE.UU.) se revistió durante una noche con 100 μ l de anticuerpo monoclonal anti-IL-8 humana 3 μ g/ml, se lavó tres veces con 200 μ l de BSA al 1% en PBS y se incubó con 100 μ l de muestras a 37°C durante una hora. Después los pocillos se lavaron tres veces y se incubaron con 100 μ l de anticuerpo anti-IL-8 humana de ratón marcado con biotina 0,1 μ g/ml durante una hora. Después de otro lavado, cada pocillo se incubó con 100 μ l de peroxidasa de rábano picante, se lavó de nuevo antes de incubar con 100 μ l de dihidrocloruro de O-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno. Se detuvo la reacción con 100 μ l de H₂SO₄ 2N y se leyó la absorbancia a 490 nm. La concentración de IL-8 en las muestras se calculó a partir de la curva estándar de IL-8.

50 Cuantificación de MIP-3 α . La cantidad de secreción de MIP-3 α se midió por ELISA de manera similar a IL-8, excepto que la placa se revistió durante una noche con 100 μ l de anticuerpo monoclonal anti-MIP-3 α humana de ratón 2,0 μ g/ml. El anticuerpo de detección, anticuerpo anti-MIP-3 α humana de ratón marcado con biotina, se usó como

anticuerpo de detección a una concentración de 50 ng/ml con un volumen de 100 µl. La concentración de MIP-3α en las muestras se calculó a partir de la curva estándar de MIP-3α.

Ensayo de viabilidad celular. La citotoxicidad de B-GOS se investigó usando un ensayo de exclusión con azul de tripano. Se cultivaron células NCM-460 en cubreobjetos a partir de una concentración inicial de 2x10⁵ células/ml. Las células se trataron por triplicado con: B-GOS (5 g/l) o medio de control. Después de 16 horas, las células NCM-460 se ensayaron en cuanto a viabilidad celular por el ensayo de exclusión con azul de tripano (Raimondi F, Crivaro V, Capasso L, Maiuri L, Santoro P, Tucci M, Barone MV, Pappacoda S, Paludetto R 2006 Unconjugated bilirubin modulates the intestinal epithelial barrier function in a human-derived in vitro model. *Pediatr Res* 60:30-33). No hubo efecto significativo de B-GOS sobre la viabilidad de las células a esta concentración.

Efecto de B-GOS sobre la inducción de la transcripción de citocinas. Se cultivaron células NCM-460 a confluencia en placas de 6 pocillos a partir de una concentración inicial de 5x10⁵ células/ml. Cuando las células alcanzaron 70% de confluencia, se trataron como sigue por cuadruplicado: (i) control negativo, (ii) control positivo de TNF-α o IL1β o flagelina (10 mg/ml), y (iii) TNF-α o IL1β o flagelina (10 mg/ml) con B-GOS (5 g/l). Después de 18 horas, el ARN celular total se aisló por extracción con Trizol-cloroformo. Usando el kit SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR, se midió la expresión de ARNm de IL-8, MIP-3α y MCP-1 en un MJ Opticon 2 y se estandarizó a la expresión de ARNm de GAPDH.

Efecto de B-GOS sobre la translocación de NF-κB. Se cultivaron células NCM-460 a 70% de confluencia en cubreobjetos y se trataron por duplicado durante 10 o 30 minutos como sigue: (i) control negativo, (ii) control positivo de TNF-α (10 ng/ml), y (iii) TNF-α (10 ng/ml) con B-GOS (5 g/l). Se retiró el medio y las células se fijaron en paraformaldehído al 4%. Después de una permeabilización con metanol y un bloqueo con suero de cabra al 10% en BSA al 0,25% en TBS, se sondaron las células con anticuerpo policlonal anti-NF-κB p65 humana de conejo. Después de lavar, las células se incubaron con anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con CyTM 3. Después se lavaron los cubreobjetos y se montaron en un portaobjetos de vidrio para ser visualizados bajo el microscopio (Nikon Eclipse TE2000-S).

Materiales

Se obtuvieron kits de desarrollo de ELISA de citocina TNF-α, IL1β, flagelina, estreptavidina HRP y CCL20-MIP-3α humana (Quantikine) en R&D Systems (Minneapolis, MN, EE.UU.). Se obtuvieron anticuerpos anti-IL-8 humana y anti-IL-8 humana de ratón en Pierce Endogen (Woburn, MA, EE.UU.). Se obtuvieron comprimidos de O-fenilendiamina en Pierce (Rockford, IL, EE.UU.). El trizol, los kits de SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR y otros reactivos necesarios para qRT-PCR se obtuvieron en Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). El medio DMEM/F12, medio CMRL, penicilina, estreptomina y tampón Hepes se obtuvieron en Gibco-Invitrogen ((Carlsbad, CA, EE.UU.). El suero bovino fetal se obtuvo en Atlanta Biologicals (Lawrenceville, GA, EE.UU.). El M3D se obtuvo en Incell Corp. (San Antonio, TX, EE.UU.). El anticuerpo policlonal anti-NF-κB (p65) humana de conejo se obtuvo en Calbiochem (Gibbstown, NJ, EE.UU.). La IgG anti-conejo de cabra del fragmento F(ab')₂ conjugado con CyTM 3 se obtuvo en Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EE.UU.). Todos los demás reactivos para inmunofluorescencia se obtuvieron en Vector Lab (Burlingame, CA, EE.UU.). Todos los demás reactivos fueron de calidad analítica o biológica molecular de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

B-Galacto-oligosacáridos B-GOS. Bimuno® fue suministrado por Clasado Ltd., Milton Keynes, Reino Unido.

Líneas celulares epiteliales intestinales. Se usaron dos modelos de cultivo epitelial intestinal humano adulto en estos estudios: las células T84 y NCM-460 son células epiteliales colónicas transformadas y no transformadas, respectivamente. Las células se cultivaron en platos de cultivo celular Falcon a 37°C con atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂ saturada con vapor de agua. El medio de cultivo de T84 consistió en DMEM/F12 suplementado con FBS (5%), tampón Hepes, glutamina, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomina (12). El medio de cultivo de NCM-460 consistió en medio M3D suplementado con FBS (10%), penicilina y estreptomina como se describió anteriormente (13).

Análisis estadístico. La inducción de citocinas fue estandarizada al control positivo con barras de error que representan el error estándar (SE). Las comparaciones entre grupos se realizaron usando un test t de Student de dos colas. Los datos de expresión de genes obtenidos por qRT-PCR se expresaron como la media con SE. Las comparaciones entre grupos se realizaron usando un test t de Student de dos colas después de una transformación logarítmica. Un valor p <0,05 se consideró estadísticamente significativo y se indicó mediante un asterisco (*), un valor p <0,01 se indicó mediante dos asteriscos (**) y un valor p <0,001 se indicó mediante tres asteriscos (***).

Resultados

Efecto de los galactooligosacáridos B-GOS sobre la secreción de citocinas en células T84 (Figura 1).

La secreción de IL-8 inducida por TNF-α en células T84 fue normalizada a 100% para permitir una comparación entre 4 experimentos independientes. Las células T84 no tratadas tenían una secreción de IL-8 basal a 20,5%. Tras una estimulación con TNF-α, la secreción de IL-8 fue aumentada significativamente en 4,9 veces (p < 0,001).

Para determinar el efecto de B-GOS, las células T84 fueron estimuladas con o sin TNF- α en presencia de galacto-oligosacáridos B-GOS (5 g/l). Las células T84 tratadas con B-GOS secretaron IL-8 a 16,4%. Esto no fue significativamente diferente del nivel basal de las células T84 no tratadas. Tras una estimulación con TNF- α , los B-GOS atenuaron significativamente la secreción de IL-8 en 38,5% ($p < 0,001$).

5 Efecto de los galactooligosacáridos B-GOS sobre la secreción de citocinas en células NCM-460 (Figura 2, Figura 5, Figura 6).

La secreción de IL-8 y MIP-3 α inducida por TNF- α en células NCM-460 fue normalizada a 100% para permitir una comparación entre 4 experimentos independientes. Las células NCM-460 no tratadas tenían una secreción de IL-8 y MIP-3 α basal a 1,7% y 4,0% respectivamente. Tras una estimulación con TNF- α , la secreción de IL-8 y MIP-3 α fue aumentada significativamente en 58,8 veces ($p < 0,001$) (Figura 2A) y 25,0 veces ($p < 0,001$) (Figura 2B) respectivamente.

Para determinar el efecto de B-GOS, las células NCM-460 fueron estimuladas con o sin TNF- α en presencia de galacto-oligosacáridos B-GOS (5 g/l). Las células NCM-460 tratadas con B-GOS secretaron IL-8 y MIP-3 α a 1,1% y 3,9% respectivamente; esto no fue significativamente diferente del nivel basal de las células NCM-460 no tratadas. Tras una estimulación con TNF- α , los B-GOS atenuaron significativamente la secreción de IL-8 y MIP-3 α en 43,5% ($p < 0,001$) (Figura 2A) y 52,1% ($p < 0,05$) (Figura 2B) respectivamente. De la misma manera, cuando las células NCM-460 se prelavaron con B-GOS antes de la estimulación con TNF- α , la secreción de IL-8 fue reducida significativamente en 32% ($p < 0,001$) incluso en ausencia de B-GOS (Figura 6). Esto sugiere que los constituyentes de la mezcla B-GOS interactúan con receptores epiteliales tales como receptores tipo peaje (TLR) para impedir la estimulación inflamatoria de la célula.

De manera similar, tras una estimulación con flagelina, los B-GOS atenuaron significativamente la secreción de IL-8 en 21,5% ($p < 0,05$) (Figura 5). No se pudo observar ningún efecto tras una estimulación con IL1 β .

Para determinar si B-GOS es citotóxico, se incubaron células NCM-460 durante 16 horas con o sin B-GOS. Los B-GOS no afectaron a la viabilidad celular, determinado mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano como se describe en los métodos.

Efecto de los galacto-oligosacáridos B-GOS sobre la expresión de citocinas (Figura 3).

Se aisló el ARN total de células NCM-460 tratadas con TNF- α y se ensayó en cuanto a expresión del ARNm de IL-8, MIP-3 α y MCP-1 por qRT-PCR. Tras una estimulación con TNF- α , la expresión del ARNm de IL-8 y MIP-3 α fue aumentada significativamente en 12,2 veces ($p < 0,001$) (Figura 3A) y 99,4 veces ($p < 0,001$) (Figura 3B) respectivamente. No se observó ningún cambio en la expresión del ARNm de MCP-1 entre ninguno de los tratamientos ($p = 0,19$) (datos no mostrados). Para determinar el efecto de B-GOS, se estimularon células NCM-460 con TNF- α en presencia de B-GOS (5 g/l). Los galacto-oligosacáridos B-GOS atenuaron significativamente la expresión del ARNm de IL-8 y MIP-3 α inducida por TNF- α en 5,7 veces ($p < 0,05$) (Figura 3A) y 58,9 veces ($p < 0,05$) (Figura 3B) respectivamente. La expresión del ARNm de MCP-1 fue reducida por los B-GOS pero no alcanzó significación ($p = 0,06$) (datos no mostrados).

Efecto de los galacto-oligosacáridos B-GOS sobre la translocación de NF- κ B (Figura 4)

Se trataron células NCM-460 colónicas adultas con TNF- α (10 ng/ml) y se ensayaron en cuanto a translocación nuclear de la proteína NF- κ B p65. En las células de control tratadas con vehículo (Figura 4A), la tinción para NF- κ B p65 estuvo predominantemente en el citoplasma, y el núcleo estaba exento de proteína p65. La NF- κ B p65 está translocada claramente en los núcleos después de 30 minutos tras una estimulación con TNF- α (Figura 4B).

Sin embargo, en presencia de B-GOS, la translocación de NF- κ B inducida por TNF- α fue inhibida parcialmente en 30 minutos (Figura 4C).

Ejemplo 2

Estudio in vivo del efecto de B-GOS en un modelo de ratón de colitis inducida por dextranosulfato de sodio

45 Materiales y métodos

Se usaron dos grupos ($n=24$ cada uno) de ratones C57BL/6 adultos (Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME, EE.UU.), criados convencionalmente (CR) y exentos de bacterias (BD), para inducir colitis. Todos los animales fueron alojados dentro de un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, y tuvieron acceso a pienso para ratones y agua a voluntad.

50 A las 6 semanas de edad, los ratones colonizados convencionalmente se alojaron en condiciones convencionales con agua no tratada (grupo CR), mientras que los ratones en el grupo BD fueron alimentados con un cóctel de antibióticos en su agua de bebida durante 2 semanas. Kanamicina (8 mg/ml), Gentamicina (0,7 mg/ml), Colistina (34.000 U/ml), Metronidazol (4,3 mg/ml) y Vanacomina (0,9 mg/ml) comprendían el cóctel de antibióticos. Las concentraciones de los antibióticos en el agua se calcularon en base al agua media consumida por el grupo de edad.

A las 8 semanas de edad, se indujo colitis intestinal alimentando DSS al 3,5% (Dextranosulfato de Sodio) (MP Biomedicals, Aurora, OH, EE.UU.) en el agua de bebida durante 5 días en todos los ratones de ambos grupos (CR y BD). A las 10 semanas de edad, la mitad de los ratones de cada grupo empezaron a recibir Bimuno (5 g/l) durante 7 días. Al final de la semana 10, se practicó la eutanasia a los animales y se recogieron sus colonos para el análisis.

5 Medidas de las citocinas

Se analizaron las citocinas IL-6 y MIP-2 murinas por ELISA (Quantikine, R&D Systems, MN, EE.UU.) en homogenatos de tejido de colon según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recogieron los colonos proximales para cada grupo y se homogeneizaron con tampón homogeneizador PBS que contenía 1% de Triton X-100 suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasa. Las disoluciones homogeneizadas se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min, y los sobrenadantes se separaron en alícuotas y se almacenaron a -70°C.

Resultados

Se determinó la capacidad de Bimuno para reducir la lesión e inflamación de colitis por DSS en ambos grupos de ratones (CR y BD) comparados con los ratones de control (sin administración de Bimuno).

En los ratones tratados con DSS convencionales, la secreción de IL-6 y MIP-2 fue inducida significativamente en 2,2 ($p < 0,0001$) y 8,3 veces ($p < 0,0001$) respectivamente. El Bimuno atenuó significativamente la secreción de IL-6 y MIP-2 en 6,6 ($p < 0,0001$) y 5,5 veces ($p < 0,0001$).

En los ratones BD tratados con DSS, la secreción de IL-6 e IP-2 fue inducida significativamente en 6,2 ($p < 0,0001$) y 27,2 veces ($p < 0,0005$) respectivamente. El Bimuno atenuó significativamente la secreción de IL-6 en 3,6 veces ($p < 0,0001$). La secreción de MIP-2 fue reducida en 1,3 veces, pero se encontró que esto no era significativo ($p = 0,126$).

En resumen, los ratones convencionales tratados con DSS desarrollaron colitis comparado con el grupo no tratado. Los ratones convencionales tratados con DSS suplementados con Bimuno tuvieron marcadores de inflamación (IL-6 y MIP-2) y reducidos significativamente, y síntomas de colitis aliviados. Se observó el mismo efecto en los ratones exentos de bacterias tratados con DSS. Esto implica que la reducción observada en inflamación debido al Bimuno no es mediada solo por la microflora. El Bimuno tiene un efecto inmuno-modulatorio directo sobre el epitelio intestinal en colitis por DSS.

Ejemplo 3

Efecto de fracciones de la mezcla de galactooligosacáridos Bimuno sobre la producción de citocinas MIP-3 α y IL-8 en presencia de la citocina inflamatoria TNF- α

30 Materiales y métodos

Recogida de fracciones de GOS de la mezcla Bimuno

A fin de separar y recoger las diferentes fracciones de galactooligosacáridos (DP2 privado de lactosa, DP3 y DP>3), se usó la cromatografía de exclusión de tamaños con una columna Biogel P2 (100 cm x 5 cm) (Pharmacia, Reino Unido) mantenida a temperatura ambiente. Todas las muestras se eluyeron a una velocidad de 2 ml/min con agua desionizada, y se monitorizaron mediante un detector 132RI (Gilson). Se retiró la lactosa de la fracción DP2 mediante la β -galactosidasa BIOLACTA FNS proporcionada por TENNOJI-KU (Osaka, Japón). La hidrólisis se realizó a 40°C, a pH 6,4, usando disolución de fosfato de sodio 100 mM como tampón, y MgCl₂ 1 mM como cofactor. El contenido de carbohidratos de cada fracción se analizó por cromatografía de exclusión iónica e intercambio iónico en una columna RCM-MONOSACCHARIDES Rezex HPLC equipada con LaChrom RI Detector L-7490 MERCK).

Los oligosacáridos se eluyeron en agua desionizada a 0,5 ml/min a 84,4°C.

Cultivo celular

La línea celular NCM460, derivada del epitelio mucoso de colon humano normal, fue proporcionada por INCELL CORPORATION LLC, y fue mantenida en medio M3base (INCELL CORPORATION LLC) suplementado con suero bovino fetal al 10% [en volumen] a 37°C en un entorno humidificado de 95% de aire, 5% de CO₂.

45 Medida de la producción de citocinas por cultivos de NCM460

Se pusieron en placa células NCM460, en una concentración de 5×10^5 células/ml, en placas de 24 pocillos, y se incubaron a 37°C en 95% de aire y 5% de CO₂. Después de 24 horas de incubación, correspondientes a 70% de confluencia, las células se trataron por triplicado con TNF- α (10 ng/ml) (TNF- α /TNFSF1A Humana Recombinante – R&D SYSTEMS), fracciones de galactooligosacáridos (0,138 g/ml de DP2; 0,049 g/ml de DP3; 0,041 g/ml de DP>3), y mezcla de TNF- α y cada fracción. El control consistió en células cultivadas en el medio. Después se incubaron las células a 37°C en 95% de aire, 5% de CO₂ durante 16 horas. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante y se congeló en alícuotas de 200 μ l, y, antes del ensayo, se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos. La concentración de citocinas (MIP-3 α y IL-8) se midió por ensayo ELISA usando el kit QUANTIKINE, proporcionado

por R&D Systems (MN, EE.UU.).

Resultados y discusión

Las 3 diferentes fracciones, recogidas usando la cromatografía de exclusión de tamaños tuvieron la siguiente cantidad de galactooligosacáridos:

- 5 a) La fracción DP2 contenía 90% de galactodisacáridos y el 10% restante estaba constituido por monosacáridos (1%), lactosa (6%), trisacáridos (2%) y pentaoligosacáridos (1%);
- b) La fracción DP3 contenía 97% de galactotrisacárido y 3% de oligosacáridos DP4;
- c) La fracción DP>3 contenía 96% de galactooligosacáridos con DP4 y DP5, y 4% de galactooligosacáridos con DP3.
- 10 El efecto de las fracciones sobre la producción de IL-8 y MIP-3 α se muestra en la Figura 8(A) y (B), respectivamente.
Para ambos experimentos, la fracción DP3 y DP>3 disminuyó la secreción de citocinas:
 - a) DP3 redujo la producción de IL-8 en 34% y la producción de MIP-3 α en 25% cuando se compara con el TNF- α en solitario;
 - b) para la fracción DP>3, la reducción fue 35% y 51% para IL-8 y MIP-3 α , respectivamente.
- 15 Los resultados para la fracción DP2 no fueron claros. La reducción para la secreción de IL-8 fue 49%, pero esta fracción no tuvo ningún efecto sobre la producción de MIP-3 α .

Ejemplo 4

Efecto de fracciones de la mezcla de galactooligosacáridos Bimuno sobre la producción de citocinas IL-8 y MIP-3 α en presencia de la citocina inflamatoria TNF- α comparado con Bimuno

20 Materiales y métodos

Se prepararon fracciones de GOS a partir de Bimuno como se describe en el Ejemplo 3.

Cultivos celulares

Se obtuvieron cultivos celulares de la línea celular NCM460 de la misma fuente que el Ejemplo 3, y se mantuvieron de la misma manera.

25 Medida de la producción de citocinas por cultivos de NCM460

- 30 Se pusieron en placa células NCM460, en una concentración de 5×10^5 células/ml, en placas de 24 pocillos, y se incubaron a 37°C en 95% de aire y 5% de CO₂. Después de 24 horas de incubación, correspondientes a 70% de confluencia, las células se trataron por triplicado con TNF- α (10 ng/ml) (TNF- α /TNFSF1A Humana Recombinante – R&D Systems), y mezcla de TNF- α y Bimuno (0,1 g/ml), TNF- α y la fracción DP=3 (0,1 g/ml) de Bimuno o TNF- α y la fracción DP>3 (0,1 g/ml) de Bimuno. El control consistió en células cultivadas en el medio. Después se incubaron las células a 37°C en 95% de aire, 5% de CO₂ durante 16 horas. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante y se congeló en alícuotas de 200 μ l, y, antes del ensayo, se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos. La concentración de citocinas (MIP-3 y IL-8) se midió por ensayo ELISA usando el kit QUANTIKINE, proporcionado por R&D Systems.

35 Resultados

Las 2 diferentes fracciones recogidas usando la cromatografía de exclusión de tamaños tuvieron la siguiente cantidad de galactooligosacáridos:

- a) Fracción DP3 contenida
- b) Fracción DP>3 contenida

- 40 El efecto de las fracciones de galactooligosacáridos y Bimuno sobre la producción de IL-8 y MIP-3 α se muestra en la Figura 9(A) y (B) respectivamente. A partir de las Figuras 9(A) y (B) puede verse que la fracción DP3 redujo la producción de IL-8 en 35% más cuando se compara con Bimuno. La reducción en la producción de MIP-3 α fue 37% mayor usando la fracción DP3 cuando se compara con Bimuno.

- 45 Con la fracción DP>3 la reducción en la producción de IL-8 comparada con Bimuno fue 40% mayor, y la reducción en la producción de MIP-3 α fue 55% mayor.

Conclusión

Cuando las fracciones DP3 y DP>3 están presentes en cantidades iguales a la mezcla de galactooligosacáridos (Bimuno) total, el efecto protector contra la inflamación es significativamente más alto.

REIVINDICACIONES

1. Un galactooligosacárido que tiene un grado de polimerización de 3 o más, galactooligosacárido que se selecciona del grupo que consiste en trisacáridos Gal (β 1-6) - Gal (β 1-4) - Glc, Gal (β 1-3) - Gal (β 1-4) - Glc, tetrasacárido Gal (β 1-6) - Gal (β 1-6) - Gal (β 1-4) - Glc y pentasacárido Gal (β 1-6) - Gal (β 1-6) - Gal (β 1-6) - Gal (β 1-4) - Glc, para uso en la prevención de un trastorno inflamatorio intestinal.
2. El galactooligosacárido según la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, presentado como un polvo o un jarabe.

Figura 1.

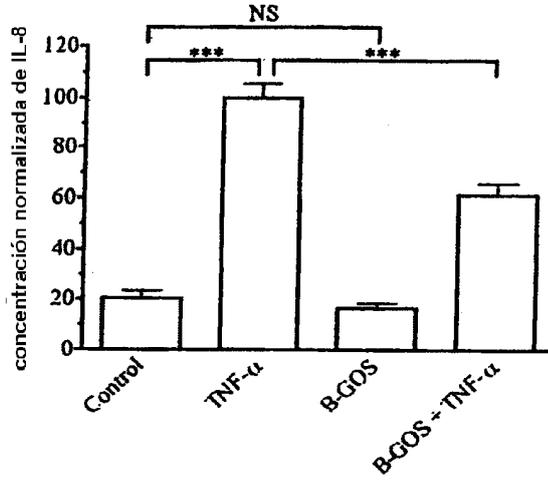


Figura 2.

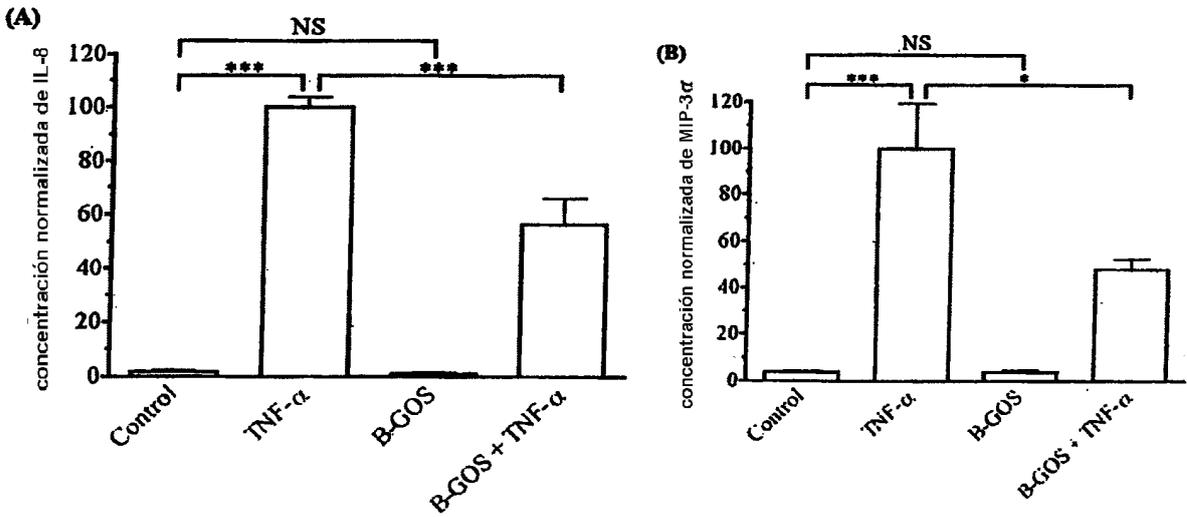


Figura 3.

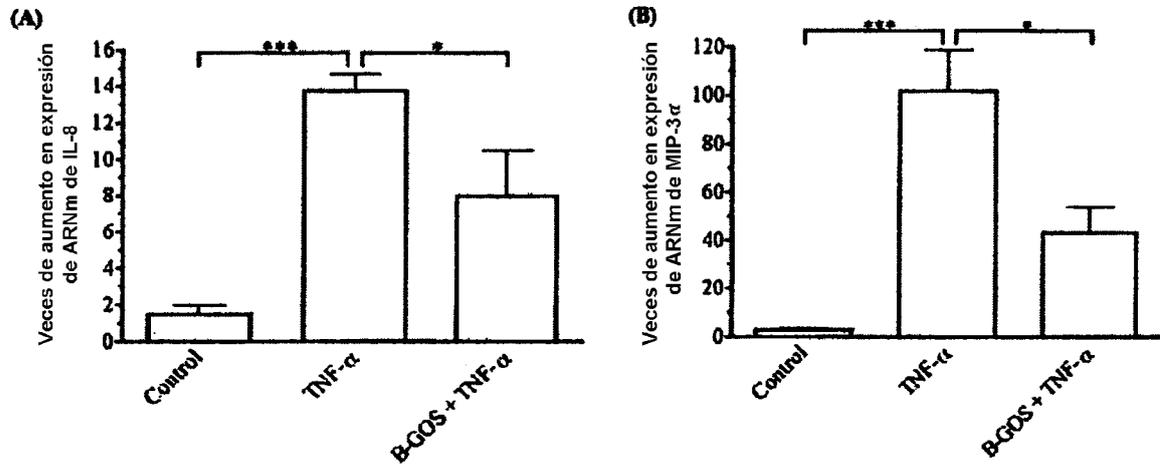


Figura 4.

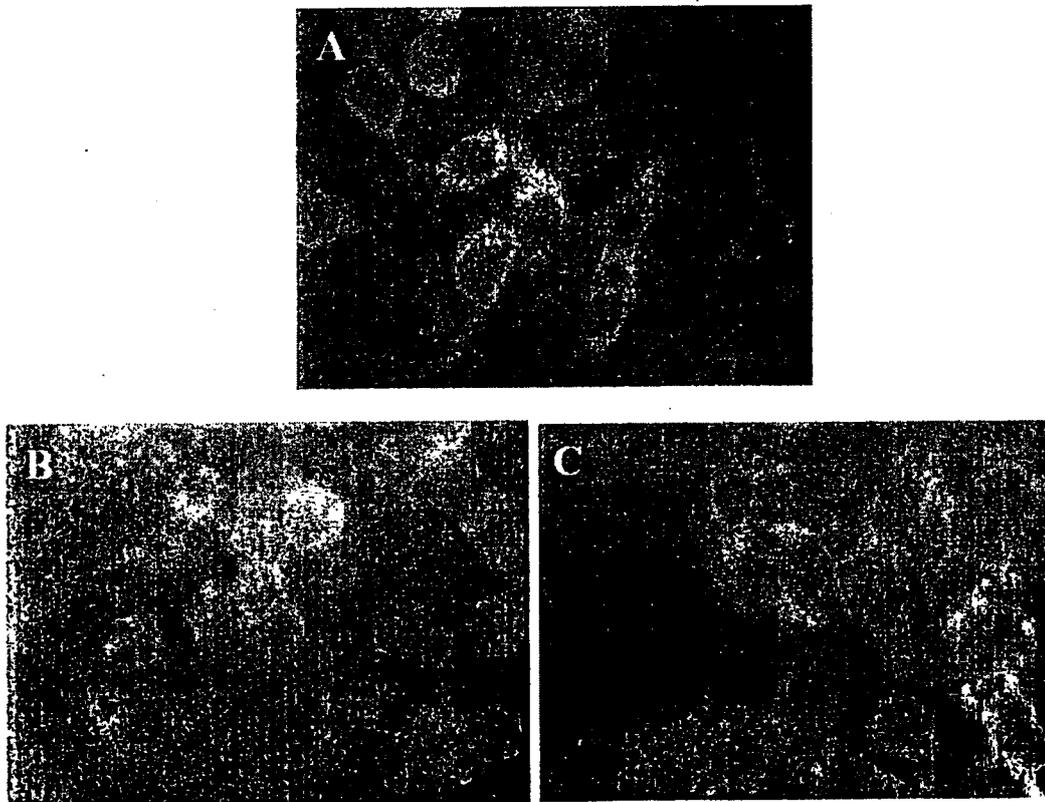


Figura 5

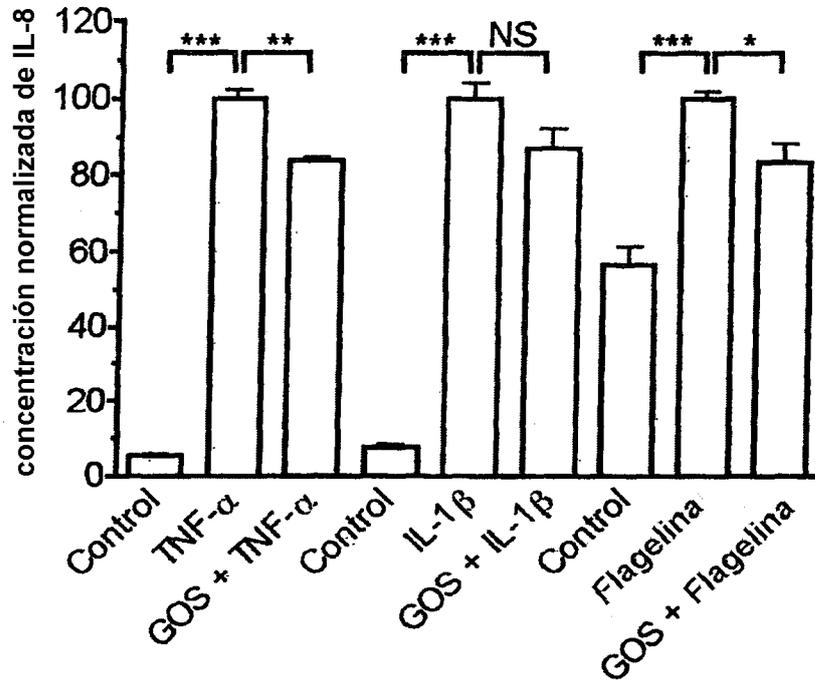


Figura 6

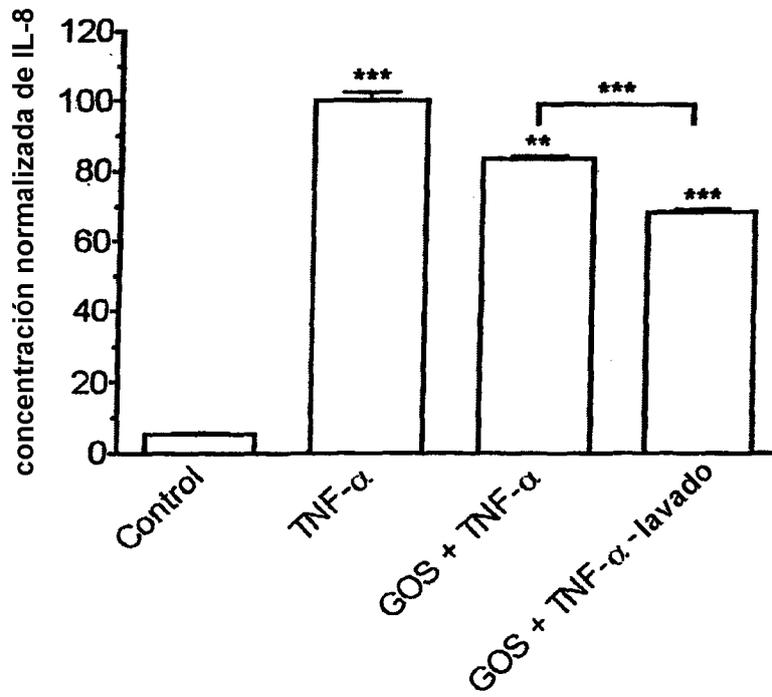


Figura 7A

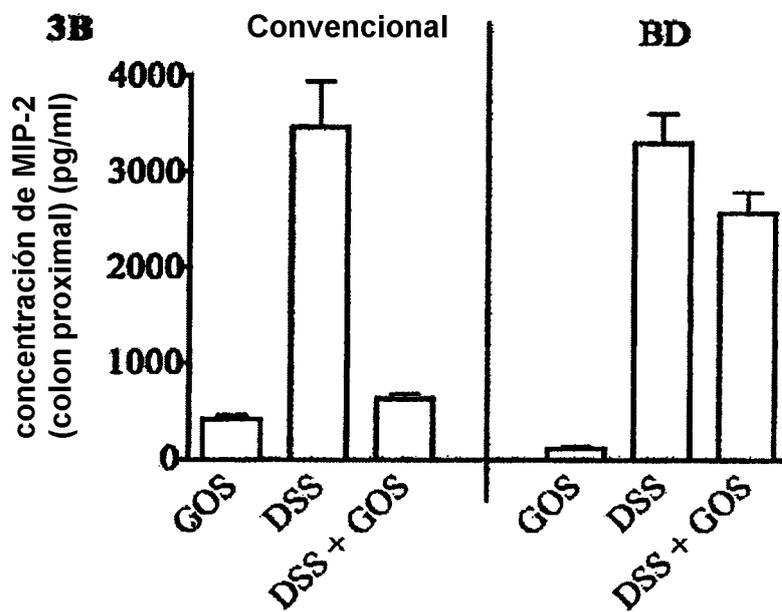
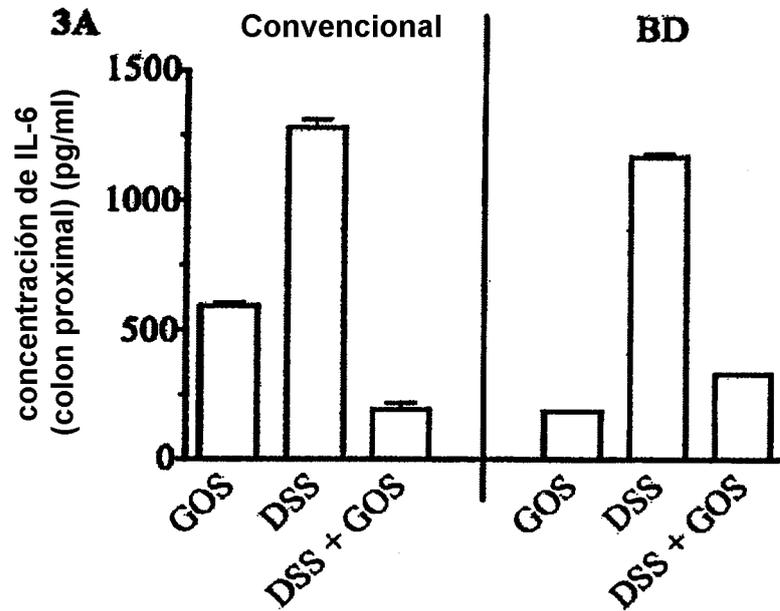


Figura 7B

Figura 8A

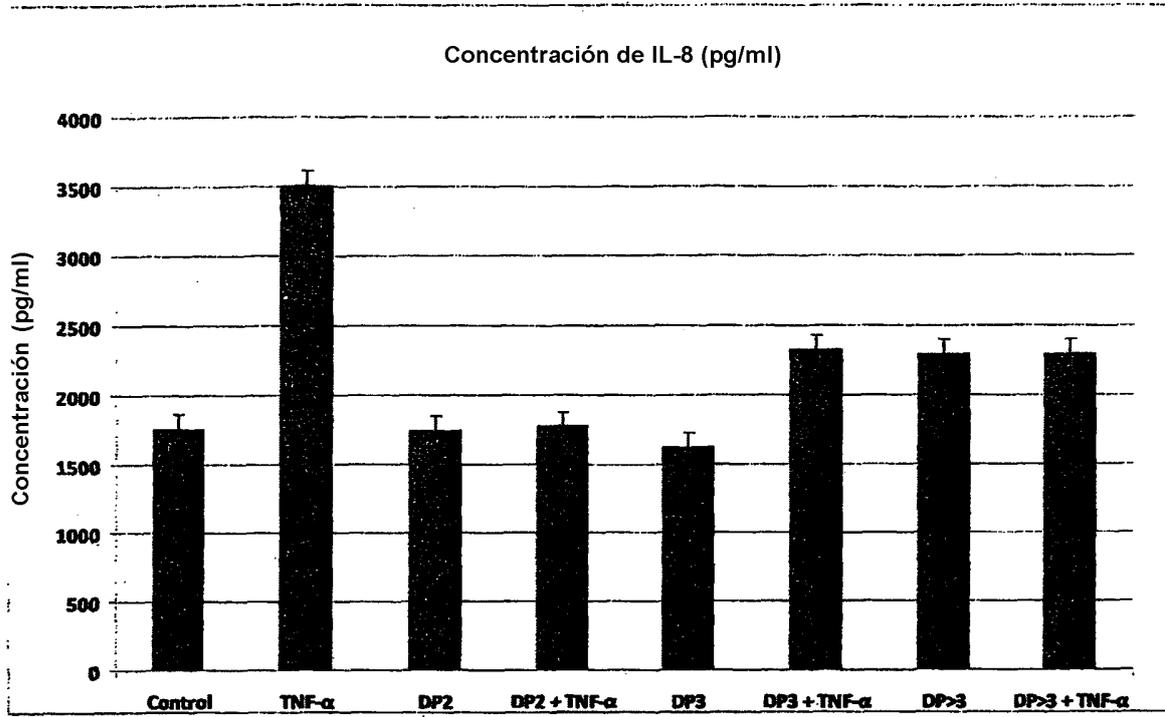
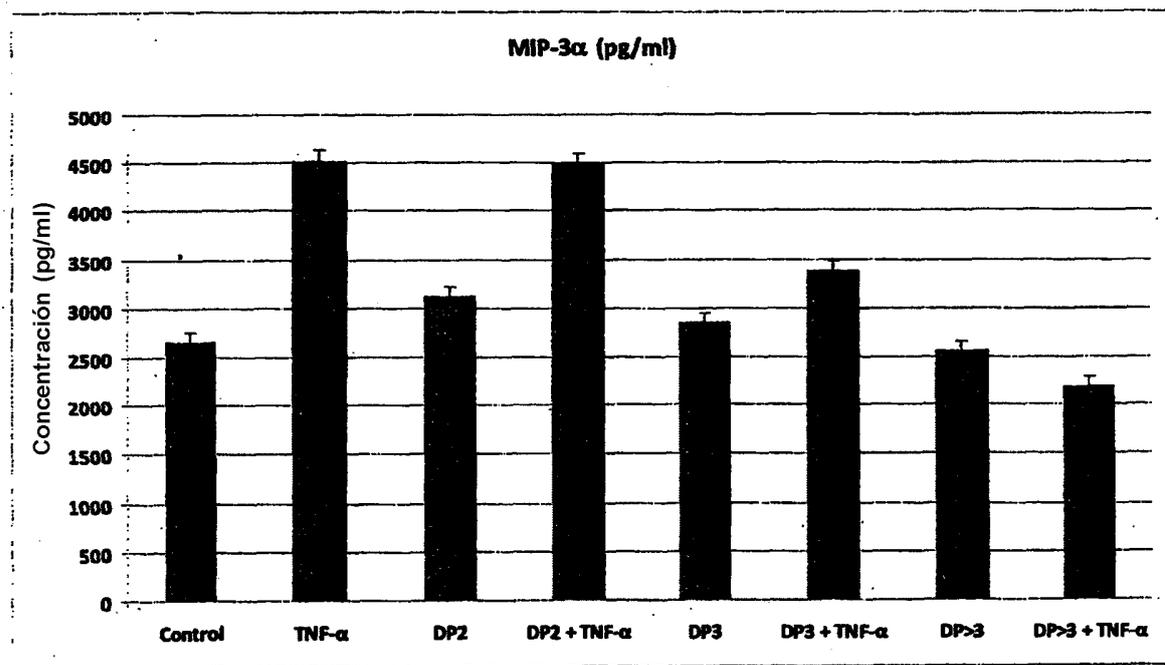


Figura 8B



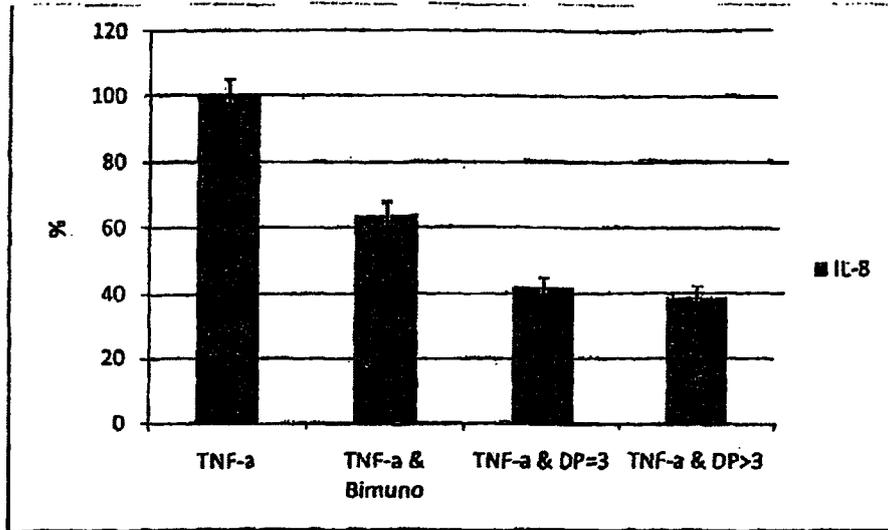


Figura 9A

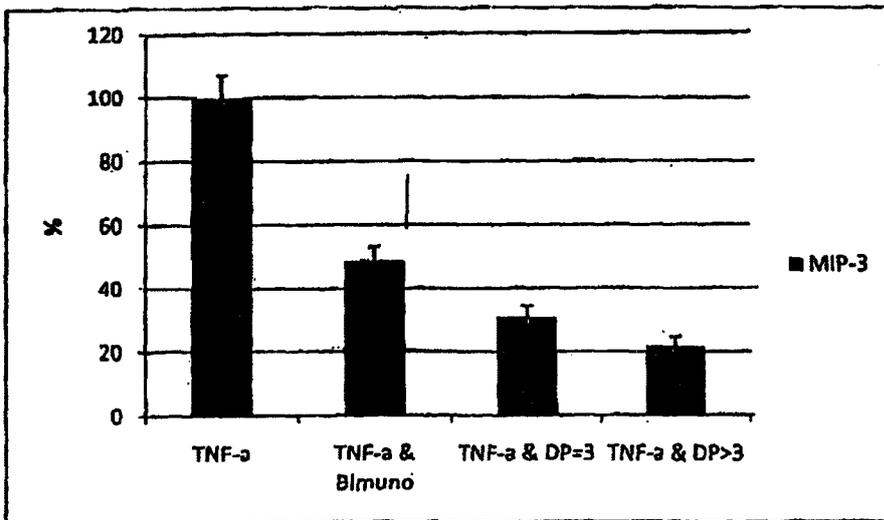


Figura 9B