



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 207 305**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **99956072 .5**

96 Fecha de presentación : **18.11.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1131080**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2001**

54 Título: **Selección y utilización de cepas de bacterias lácticas moduladoras de la inmunidad no específica.**

30 Prioridad: **18.11.1998 FR 98 14471**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.05.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **14.11.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **14.11.2011**

73 Titular/es: **COMPAGNIE GERVAIS DANONE**
17 Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR

72 Inventor/es: **Cayuela, Chantal;**
Dugas, Nathalie y
Postaire, Eric

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 207 305 T5

DESCRIPCIÓN

Selección y utilización de cepas de bacterias lácticas moduladoras de la inmunidad no específica.

- 5 La invención se refiere a la utilización de bacterias lácticas como reguladores de la inflamación de la mucosa intestinal.

Las bacterias lácticas se utilizan tradicionalmente para fabricar productos alimentarios fermentados, en particular productos lácteos.

- 10 Se ha informado de que además de sus cualidades nutricionales, algunos de estos productos alimentarios ejercían efectos beneficiosos para la salud; estas propiedades han sido objeto de un interés particular desde hace algunas décadas, y se han efectuado numerosas investigaciones con el fin de confirmarlas y de definir más concretamente el papel que desempeñan los fermentos lácticos.

- 15 De este modo se ha demostrado que ciertas bacterias lácticas, en particular entre los lactobacilos y las bifidobacterias, mejoraban la inmunidad respecto de agentes infecciosos [PAUBERT-BRAQUET *et al.*, Int. Immunother. 11, 153-161 (1995); KAILA *et al.*, Dis. Child, 72, 51-53 (1995); HUDAULT *et al.*, Appl. Environ. Microb. 63, 513-518 (1997)], y poseían también una actividad antitumoral [HAYATSU *et al.*, Cancer Lett. 73, 173-179 (1993); HOSONO *et al.*, Agric. Biol. Chem. 54, 1639-1643 (1990), HOSODA *et al.*, J. Dairy. Sci. 75, 976-981 (1992)].

- 25 Estos efectos han sido particularmente atribuidos a una acción sobre la composición de la microflora intestinal, en detrimento de los microorganismos patógenos, y/o a una acción más directa del sistema inmunitario, que se manifiesta en particular por un aumento del nivel de citoquinas activadoras del sistema inmunitario, tales como IFN- γ o interleuquinas, así como un aumento del número de células activadas que intervienen en la respuesta inmune específica o no específica, tales como los linfocitos y los macrófagos, y una mayor secreción de inmunoglobulinas [PERDIGÓN *et al.*, Int. J. Immunother. 9, 29-52, (1993); PORTIER *et al.*, Int. J. Immunother. 9, 217-224 (1993); SOLIS PEREYRA y LEMONNIER, Nutr. Research 13, 1127-1140 (1993)]; DE SIMONE *et al.*, Int. J. Immunother. 9, 23-28 20 (1993); PERDIGON *et al.*, J. Dairy Res. 61, 553-562 (1994); SCHIFFRIN *et al.*, J. Dairy Sci. 78, 491-497 (1995)].

- 35 Sin embargo, parece que los efectos beneficiosos inducidos por las bacterias lácticas pueden variar según el origen de la patología en cuestión, la especie y/o la cepa bacteriana utilizada, y las condiciones de administración. Para mejor adaptar la utilización de estas bacterias, o de los productos que las contienen, en el marco del tratamiento o de la prevención de patologías específicas, y para estar en condiciones de seleccionar las bacterias más apropiadas para la utilización deseada, es necesario por lo tanto, conocer mejor los mecanismos por los cuales se ejercen sus efectos.

- 40 Los inventores se han propuesto estudiar el efecto sobre la mucosa intestinal de bacterias lácticas del grupo *Lactobacillus casei*; han elegido, con este objetivo la cepa de *L. Casei* DN 114001. Esta cepa se describe en la solicitud PCT WO 96/20607 a nombre de COMPAGNIE GERVAIS DANONE, y se registró el 30 de diciembre de 1994, en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos) gestionado por el Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, en París, con el número I-1518, y se han demostrado sus propiedades beneficiosas en el marco del tratamiento de las diarreas.

- 45 Los inventores han estudiado el efecto *in vitro* de esta cepa de *L. Casei* sobre la producción de mediadores de la inmunidad no específica (citoquinas-proinflamatorias y óxido nítrico) por enterocitos cultivados.

- 50 Estas líneas de células, que proceden del epitelio intestinal humano, constituyen un modelo de estudio de la respuesta de éste a una agresión infecciosa o de otro tipo. Esta respuesta se manifiesta en particular por la producción de citoquinas proinflamatorias (principalmente IL-1, IL-6, TNF- α) y de óxido nítrico (NO), generado por la isoforma inducible de la NO-sintasa (iNOS). El óxido nítrico participa, por sus propiedades antimicrobianas, en la defensa contra los microorganismos patógenos, y cuando se produce en pequeñas cantidades, en la protección de la mucosa intestinal. Sin embargo, en grandes dosis, reduce la viabilidad de las células epiteliales, y contribuye a la instauración y al mantenimiento de un estado inflamatorio crónico [ALICAN y KUBES, Am. J. Physiol. 270, G225-237, (1996); TEPPERMAN *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 271, 1477-1482, (1994)] La producción de NO por los enterocitos cultivados se puede inducir por las citoquinas proinflamatorias [VALETTE *et al.*, Br. J. Pharmacol., 121, 187-182 (1997); KOLIOS *et al.*, Br. J. Pharmacol., 116, 2866-2872, (1995), así como por las toxinas lipopolisacáridicas (LPS) de ciertas bacterias gram negativo (TEPPERMAN *et al.*, 1994, publicación anteriormente mencionada). Unos estudios recientes [SALZMAN *et al.*, Gastroenterology. 114., 93-102, (1998); WITTHOFT *et al.*, Am. J. Physiol., 275, G564-571, (1998)] indican que las bacterias enteropatógenas *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Shigella flexneri* inducen la expresión de la iNOS y la producción de NO en cultivos de enterocitos, preactivos o no por citoquinas proinflamatorias.

- 65 Los inventores han constatado actualmente que, en el caso de sus experimentaciones con *L. Casei*, la acción sobre la producción de citoquinas proinflamatorias y de NO variaba según el estado de activación de los enterocitos. En

efecto, cuando las células están en su estado basal, no se observa ningún efecto de *L. Casei*; cuando están activadas por la adición de citoquinas proinflamatorias (lo que reproduce las condiciones de una agresión, infecciosa o de otro tipo), se observa una producción reducida de NO y de TNF; esta respuesta a la agresión aumenta muy significativamente por la adición de *L. Casei*. Finalmente, en el caso de células hiperactivadas por la adición de citoquinas inflamatorias y de LPS (lo que reproduce las condiciones de un estado inflamatorio patógeno), se observa por el contrario, una reducción de la producción de NO y de TNF, que vuelve a un nivel óptimo.

Parece por lo tanto que esta cepa de *L. Casei* favorece una respuesta adaptativa de las células a una agresión mediante la modulación de factores que intervienen en la inmunidad no específica.

La puesta en evidencia de estas propiedades permite proponer la utilización de la cepa CNCM I-1518 de *L. Casei*, para la obtención de composiciones inhibitoras de una respuesta inflamatoria patógena, para la prevención o el tratamiento de patologías inflamatorias crónicas del intestino (colitis, enteritis, enfermedad de Crohn, rectocolitis hemorrágicas, etc.), sean estas patologías de origen infeccioso (inducidas por bacterias, virus, levaduras, etc.) o no; son particularmente apropiadas en el marco del tratamiento de los estados inflamatorios crónicos.

Ventajosamente, se utilizará una cepa capaz de aumentar además la producción de NO por cultivos de enterocitos preactivados por citoquinas proinflamatorias.

Según la invención, las bacterias lácticas se pueden utilizar en forma de bacterias enteras vivas o no, en forma de lisado bacteriano, o en forma de fracciones bacterianas; las fracciones bacterianas adecuadas para esta utilización se pueden elegir ensayando sus propiedades de aumento de la producción de NO por cultivos de enterocitos preactivados por citoquinas proinflamatorias, y de reducción de la producción de NO por cultivos de enterocitos preactivados por citoquinas proinflamatorias y LPS bacterianos.

Preferiblemente, estas composiciones se pueden administrar en forma de complementos alimentarios. Puede tratarse en particular de productos lácteos fermentados; en este caso, las bacterias lácticas utilizadas, según la invención, para la obtención de estas composiciones pueden formar parte del fermento utilizado para la obtención de estos productos lácteos.

Se utiliza la cepa CNCM I-1518.

Se pueden obtener nuevas cepas de bacterias lácticas provistas de propiedades moduladoras de la inmunidad no específica y utilizables en particular para la obtención de composiciones reguladoras de la respuesta inflamatoria de los enterocitos, por la utilización de un procedimiento de cribado que comprende la selección de cepas de bacterias lácticas capaces de reducir la producción de NO por cultivos de enterocitos preactivados por citoquinas proinflamatorias y LPS bacterianos.

Ventajosamente, dicho procedimiento comprende además una etapa de selección de las cepas capaces de aumentar la producción de NO por cultivos de enterocitos preactivados por citoquinas proinflamatorias, y opcionalmente, una etapa de selección de las cepas que no ejercen ningún efecto sobre la producción de NO por enterocitos no activados.

Según una realización preferida del procedimiento según la invención, dichas cepas se criban a partir de cultivos de bacterias lácticas elegidas en el grupo constituido por lactobacilos, lactococos, estreptococos y las bifidobacterias.

La invención se refiere también a los alimentos y complementos nutricionales, en particular a los productos lácteos fermentados que contienen estas nuevas cepas, o productos derivados de éstas, particularmente por lisis y/o fraccionamiento celular.

La presente invención se entenderá mejor con la ayuda del siguiente complemento de descripción, que se refiere a ejemplos no limitativos que muestran la puesta en evidencia de las propiedades de la cepa CNCM I-1518.

Protocolos experimentales generales

Las citoquinas recombinantes humanas (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , 10⁷ U/mg) utilizadas proceden de la sociedad IMMUGENEX (Los Angeles, CA); el PDTC (inhibidor de la formación del factor de transcripción NF κ -B), el L-NAME (inhibidor de las NO-sintasas), y el lipopolisacárido de *Escherichia coli* proceden de la sociedad SIGMA (St Louis, Misuri).

Los kits de dosificación por ELISA de las citoquinas IL-1 β , y TNF- α proceden de la sociedad BIOSOURCE.

Los extractos totales de *L. Casei* utilizados durante los experimentos se obtienen por sonicación durante 10 minutos de suspensiones de la cepa CNCM I-1518, para romper las bacterias.

Cultivo y estimulación de los enterocitos

Se han utilizado las 2 líneas de células de carcinoma del colon HT29 y Caco-2.

La línea HT29, inicialmente aislada por FOGH y TREMPER (Human Tumor Cells *In Vitro*, 115-156, J. FOGH Ed, Plenum Press, Nueva York, 1975) está disponible en el registro ATCC, (Rockville EE.UU.), con el número ATCC HTB-38.

La línea Caco-2, inicialmente aislada por FOGH (J. Natl. Cancer Inst. 58, 209-214, 1977) está disponible en el registro ATCC (Rockville EE.UU.), con el número ATCC HTB-37.

Leyendas de las figuras

La figura 1 representa la producción de NO por las células Caco-2, preactivadas (*) o no (◯) por el CYTOMIX, o por las células HT-29 preactivadas (◼) o no (◻) por el CYTOMIX, en presencia de cantidades crecientes de extracto total de la cepa CNCM I-1518.

La figura 2 representa el efecto del L-NAME sobre la producción de NO por las células Caco-2 o por las células HT-29 preactivadas por el CYTOMIX, en presencia o no de extracto total (3% v/v) de la cepa CNCM I-1518, (◻) + L-NAME (◼) Control

La figura 3 representa el efecto del L-NAME y del PDTC sobre la producción de TNF por las células Caco-2 o por las células HT-29 preactivadas por el CYTOMIX, en presencia o no de extracto total (3% v/v) de la cepa CNCM I-1518. (◻) + L-NAME (◼) Control ◻ + PDTC

La figura 4 representa la producción de NO por las células Caco-2, preactivadas por el CYTOMIX solo (◯) o por el CYTOMIX + LPS (*), o por las células HT-29 preactivadas por el CYTOMIX solo (◻) o por el CYTOMIX + LPS (◼) en presencia de cantidades crecientes de extracto total de la cepa CNCM I-1518.

Ejemplo 1

Efecto de *L. casei* sobre la producción de óxido nítrico por las líneas de células epiteliales del colon

Cada una de las 2 líneas se ha sembrado en una cantidad de 2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos, en medio DMEM suplementado con 5% de SVF, con 100 U/ml de penicilina, con 100 µg/ml de estreptomicina y con 2 mM de L-glutamina.

Las células se han preincubado durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂, en presencia de CYTOMIX (mezcla de IL- β : 10 ng/ml, TNF- α : 25 ng/ml, IFN- γ : 10³ U/ml). Las células se incuban a continuación durante 24 horas adicionales en presencia o no de cantidades crecientes de extractos totales de *L. Casei* (en % vol/vol).

Después de la incubación, los sobrenadantes de cultivo se recuperan y se congelan antes de la determinación de la concentración de nitritos. Para ciertos experimentos, se añade L-NAME (1 mM), que es un análogo de la L-arginina y que constituye un inhibidor competitivo específico de las No-sintasas, al mismo tiempo que los extractos de *L. Casei*.

Se evalúa la cantidad de NO producida por la dosificación en los sobrenadantes de cultivo, de los derivados estables de este radical después de su reacción en medio acuoso: los nitritos y los nitratos. Los nitratos en un primer tiempo se reducen en nitritos por bacterias que expresan la nitrato-reductasa y los nitritos se dosifican a continuación por el procedimiento de GRIESS. A 100 µl de sobrenadante se añaden 100 µl de una solución compuesta en volumen por una solución de sulfanilamida al 1% en ácido acético al 60%. Se realiza una curva de calibración estándar en presencia de diferentes concentraciones de nitrito de sodio diluido en medio de cultivo (DMEM 5% SVF). A continuación, se determinan las absorbencias en 540 nm utilizando un lector MULTISCAN MCC340, (LABSYSTEM).

La figura 1 muestra que en presencia del CYTOMIX solo, no se observa más que una producción limitada de NO por las líneas HT-29 y Caco-2; esta producción aumenta de manera dosis-dependiente por la adición del extracto de *L. Casei*. Se observa un efecto máximo para una concentración de aproximadamente el 3% (v/v) de extracto de *L. Casei*. En ausencia de CYTOMIX, *L. Casei* no tiene ningún efecto sobre la producción de NO de una u otra línea.

La figura 2 muestra que esta producción inducida por el CYTOMIX se inhibe por la adición de L-NAME, en presencia o no de extracto total de *L. Casei* (3% v/v).

Ejemplo 2

Efecto de *L. casei* sobre la producción de Tnf- α por las líneas de células epiteliales del colon

Cada una de las 2 líneas se ha sembrado en una cantidad de 2×10^6 células/pocillo en placas de 24 pocillos, en medio DMEM suplementado con 5% de SVF, con 100 U/ml de penicilina, con 100 µg/ml de estreptomicina y con 2 mM de L-glutamina. Las células se han preincubado durante 24 horas en presencia de CYTOMIX, y a continuación durante 24 horas más en presencia de extractos totales de *L. Casei*. Para ciertos experimentos se ha añadido L-NAME (1 mM) o un inhibidor de la vía de transducción) NFκB (el PDTC : 10 pM) al mismo tiempo que los extractos bacterianos.

Los sobrenadantes de cultivo se recuperan a continuación y se determina su concentración de citoquinas por ELISA.

La figura 3 muestra que en presencia del CYTOMIX solo, no se observa más que una baja producción de TNF-α por la línea Caco-2, y una ausencia de producción de esta citoquina por la línea HT-29. Esta producción aumenta en gran medida para las dos líneas, por la adición de extracto total de *L. Casei*; se inhibe por la adición de L-NAME o de PDTC, lo que demuestra que la activación de la producción de citoquinas proinflamatorias por *L. Casei* hace intervenir la producción de NO y la activación de NFκB.

Los resultados presentados en la siguiente tabla I muestran que la adición de *L. Casei* a las células preactivadas por el CYTOMIX activa también la producción de IL-1β.

TABLA 1

Célula	Preactivación	Estimulación	IL-1β (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
Caco-2	Ninguna	Ninguna	SD	SD
Caco-2	CYTOMIX	Ninguna	150\pm15	75\pm11
Caco-2	Ninguna	CNCM I-1518	95\pm8	SD
Caco-2	CYTOMIX	CNCM I-1518	1254\pm55	975\pm85
HT-29	Ninguna	Ninguna	SD	SD
HT-29	CYTOMIX	Ninguna	SD	SD
HT-29	Ninguna	CNCM I-1518	SD	SD
HT-29	CYTOMIX	CNCM I-1518	908\pm63	789\pm45

SD= Sin determinar

Ejemplo 3

Efecto de *L. casei* en presencia de LPS de bacterias gram -, sobre la producción de óxido nítrico por las líneas de células epiteliales del colon preactivadas por citoquinas proinflamatorias

El protocolo es idéntico al del ejemplo 1 anterior, añadiéndose 10 µg/ml de LPS de *E. coli* durante la incubación con el extracto total de *L. casei*.

Los resultados se ilustran en la figura 4 que muestra una producción importante de NO en ausencia de *L. casei* (células estimuladas por CYTOMIX + LPS), que se reduce en presencia de cantidades crecientes de *L. casei*, hasta volver al nivel de la de las células activadas por las citoquinas solas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de bacterias lácticas de la cepa de *L. casei* CNCM I-1518, para la obtención de una composición para prevenir o tratar patologías inflamatorias crónicas del intestino.
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición está en forma de un complemento alimentario.
- 10 3. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque dicha composición está en forma de un producto lácteo fermentado.
- 15 4. Procedimiento de cribado de nuevas cepas de bacterias lácticas provistas de propiedades moduladoras de la inmunidad no específica, caracterizado porque comprende la selección de cepas de bacterias lácticas capaces de inhibir la producción de NO por cultivos de enterocitos preactivados por citoquinas proinflamatorias y LPS bacterianos.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque comprende además una etapa de selección de las cepas capaces de aumentar la producción de NO por cultivos de enterocitos preactivados por citoquinas proinflamatorias, y opcionalmente, una etapa de selección de las cepas que no ejercen ningún efecto sobre la producción de NO por enterocitos no activados.
- 25 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, caracterizado porque dichas cepas se criban a partir de cultivos de bacterias lácticas elegidas en el grupo constituido por los lactobacilos, los lactococos, los estreptococos y las bifidobacterias.

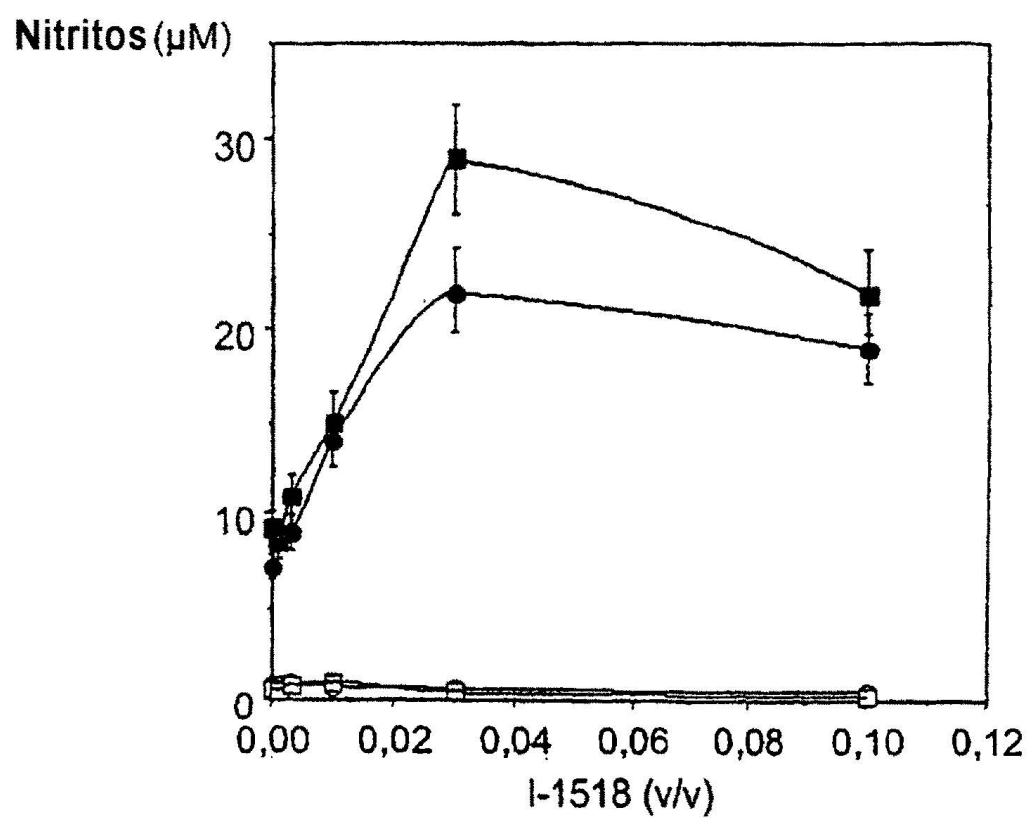
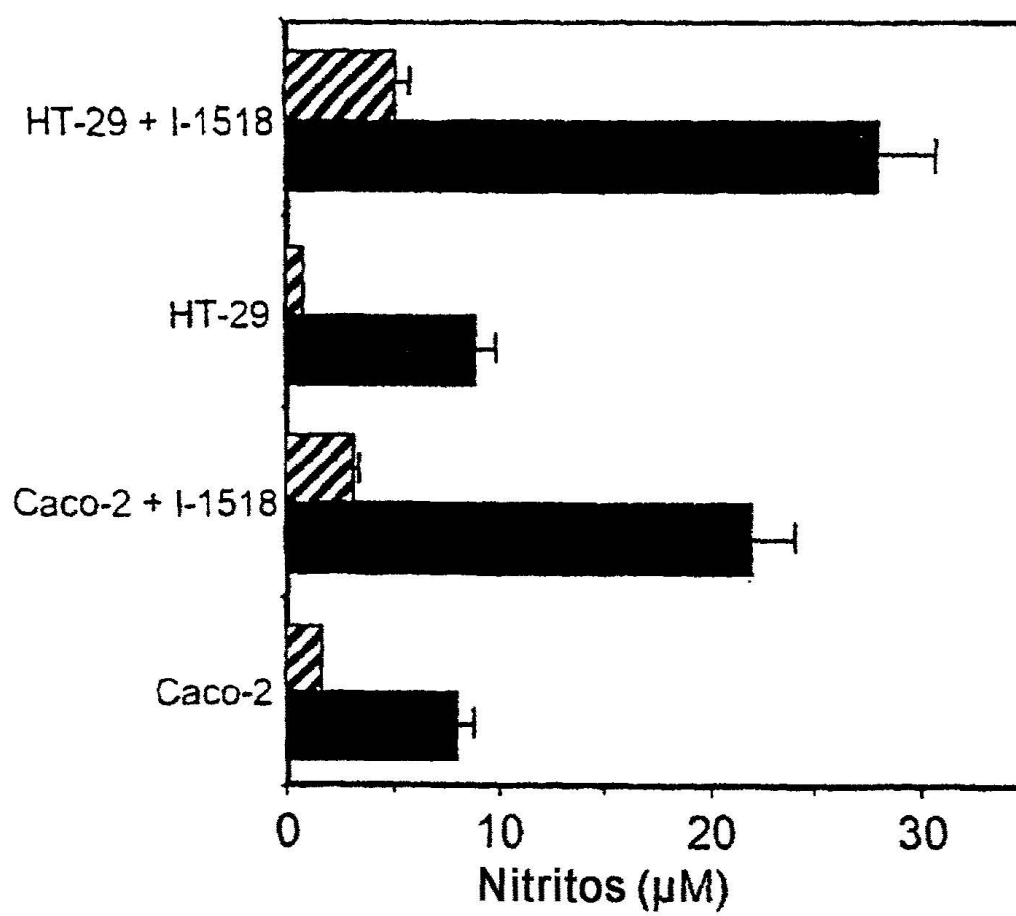


FIG. 1.

**FIG. 2.**

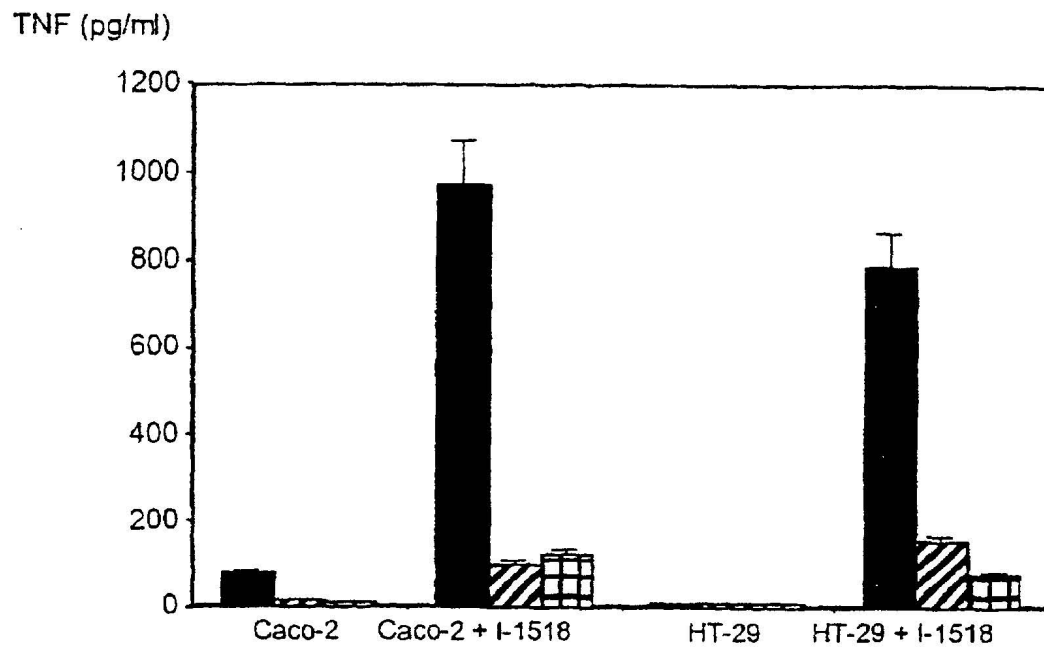
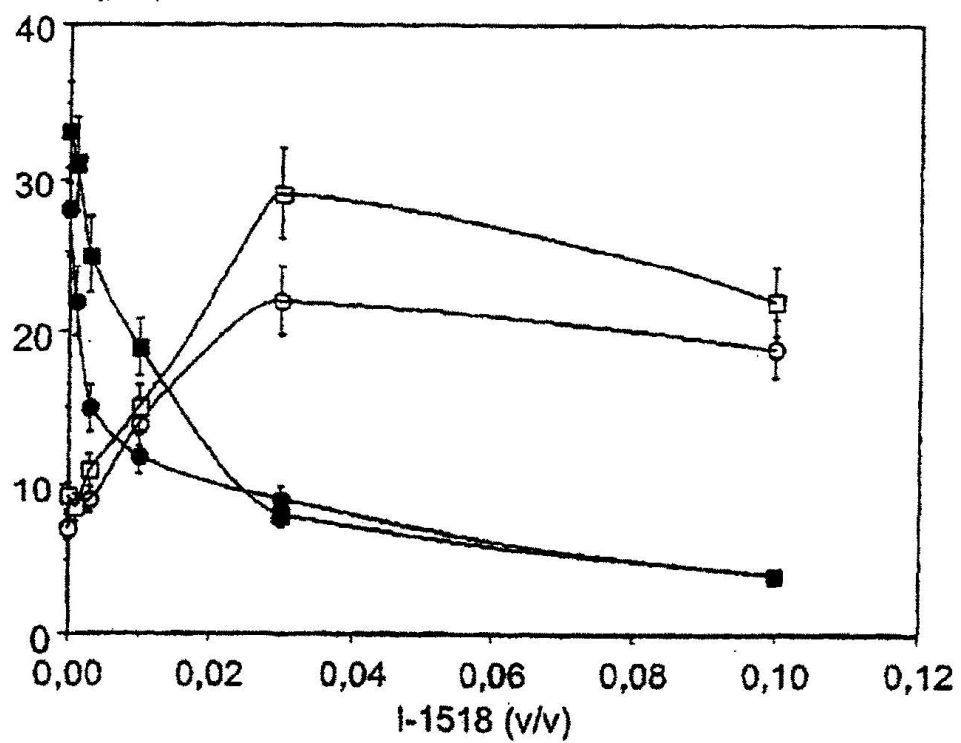


FIG. 3.

Nitratos/Nitratos (μM)**FIG. 4.**