

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 987**

51 Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 1/18 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2006 E 06806911 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1931762**

54 Título: **Uso de una cepa de levadura recombinante que produce un compuesto antiinflamatorio en la fabricación de un medicamento para tratar colitis**

30 Prioridad:

03.10.2005 EP 05109153

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

04.04.2013

73 Titular/es:

**ACTOGENIX N.V. (100.0%)
TECHNOLOGIEPARK 4
9052 ZWIJNAARDE, BE**

72 Inventor/es:

**ROTTIERS, PIETER;
VANDENBROUCKE, KLAAS y
ISERENTANT, DIRK**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 399 987 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 una cepa de levadura recombinante que produce un compuesto antiinflamatorio en la fabricación de un medicamento para tratar colitis

- 5 En general, la invención se refiere a composiciones para la administración en la mucosa intestinal de compuestos antiinflamatorios, preferentemente de agentes antiinflamatorios sensibles a ácido tales como IL10 y/o un receptor de TNF soluble y/o factor trébol por medio de la vía oral. La característica preferida de acuerdo con la invención es la inoculación con una suspensión de células de levadura recombinantes vivas, preferentemente células de *Saccharomyces* que se han diseñado para producir las proteínas respectivas. Como ejemplo, se usaron ratones en los que se había inducido una inflamación crónica del colon distal por administración con dextranosulfato de sodio (DSS). El tratamiento tal como se registró por evaluación histológica dio como resultado claramente una regresión de la inflamación y de los síntomas de la enfermedad. El hallazgo es altamente inesperado puesto que se asumió que sólo las bacterias del ácido láctico vivas que pueden interaccionar con la mucosa intestinal eran adecuadas para administrar citocinas y curar la colitis.
- 10
- 15 El sistema inmunitario en un mamífero es diverso y complejo e incluye reacciones y mecanismos inmunitarios naturales y adaptativos. El sistema inmunitario a menudo se describe en términos de respuestas inmunitarias humorales o bien celulares. La inmunidad humoral se refiere en general a la producción de anticuerpos y acciones por células B; la inmunidad celular está mediada por células incluidas las células T, células dendríticas, neutrófilos, monocitos y macrófagos. Las células T y las células B son las categorías de linfocitos.
- 20 Uno de los mecanismos por el que el sistema inmunitario normalmente actúa y se regula a sí mismo incluye la producción de las denominadas citocinas. Se sabe que las citocinas median en varias respuestas inmunitarias positivas y negativas. Normalmente, las citocinas actúan uniéndose a un receptor sobre una célula diana. Se puede interferir la actividad de las citocinas de diversas formas, por ejemplo, por la administración de receptores solubles (dominios extracelulares del receptor) o por análogos o derivados de citocinas.
- 25 La IL-10 es una citocina que puede mediar en varias acciones o efectos. Se sabe que la IL-10 está implicada en el control de las respuestas inmunitarias de diferentes clases y subconjuntos de células Th (células T auxiliares).
- 30 La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se refiere a un grupo de trastornos gastrointestinales caracterizado por una inflamación no específica crónica de partes del tubo digestivo. La colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC) son los ejemplos más destacados de EII en seres humanos. Están asociadas con muchos síntomas y complicaciones, incluidas el retraso del crecimiento en niños, prolapso rectal, sangre en heces (por ejemplo, melena y/o hematoquecia), emaciación, deficiencia de hierro, y anemia, por ejemplo, anemia por deficiencia de hierro y anemia de enfermedad crónica o de inflamación crónica. La etiología o etiologías de la EII no están claras. Se hace referencia a esto en Wyngaarden y Smith (eds.) Cecil's Textbook of Medicine (W.B. Saunders Co. 1985), Berkow (ed.) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy (Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, 1982), y Harrison's Principles of Internal Medicine, 12ª ed., McGraw-Hill, Inc. (1991).
- 35 La incidencia de la EII varía enormemente con la situación geográfica. Un estudio de colaboración sobre Europa muestra una incidencia por 100.000 de 10,4 para la CU y de 5,6 para la EC con una incidencia mayor de un 40% y un 80% respectivamente para CU y EC en centros del norte en comparación con los del sur. Puesto que tanto la CU como la EC son afecciones duraderas, corresponden a alteraciones reales en la calidad de vida. La enfermedad de Crohn tiene una distribución de aparición por edades bimodal, lo que muestra picos notables en la incidencia a los 20 y 50 años de edad. Se asocia una incidencia mayor y un perfil de enfermedad más grave con el pico a la edad más joven. Esto hace que la EC sea especialmente penosa ya que los adolescentes y adultos jóvenes afectados están virtualmente privados de altas expectativas de vida, asociado de manera tan particular con este grupo social.
- 40
- 45 La colitis ulcerosa se refiere a una enfermedad ulcerosa, inflamatoria, no específica y crónica que tiene manifestaciones principalmente en la mucosa colónica. Se caracteriza con frecuencia por diarrea hemorrágica, calambres abdominales, sangre y moco en las heces, malestar, fiebre, anemia, anorexia, pérdida de peso, leucocitosis, hipoalbuminemia y una tasa de sedimentación de eritrocitos (TSE) elevada.
- Las complicaciones pueden incluir hemorragia, colitis tóxica, megacolon tóxico, fístulas rectovaginales ocasionales y un riesgo incrementado de desarrollo de cáncer de colon.
- 50 La colitis ulcerosa también está asociada con complicaciones distantes del colon, tales como artritis, espondilitis anquilosante, sacroileítis, uveítis posterior, eritema nodoso, pioderma gangrenoso y episcleritis.
- El tratamiento varía considerablemente con la gravedad y duración de la enfermedad. Por ejemplo, en un ataque grave se indica con frecuencia tratamiento fluido para evitar la deshidratación y el desequilibrio electrolítico. Adicionalmente, a veces son útiles medidas dietéticas especiales. Las medicaciones incluyen varios corticosteroides, sulfasalacina y alguno de sus derivados, y posiblemente fármacos inmunosupresores.
- 55 La enfermedad de Crohn comparte muchas características en común con la colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn se puede distinguir porque las lesiones tienden a estar claramente delimitadas del intestino normal adyacente,

en contraste con las lesiones de la colitis ulcerosa que son bastante difusas. Adicionalmente, la enfermedad de Crohn afecta predominantemente al íleon (ileítis) y al íleon y colon (ileocolitis). En algunos casos, se enferma solo el colon (colitis granulomatosa) y a veces está implicado todo el intestino delgado (yeyunoileítis). En casos raros, están implicados el estómago, el duodeno o el esófago. Las lesiones incluyen un granuloma epiteloide de tipo sarcoides en casi la mitad de los casos clínicos. Las lesiones de la enfermedad de Crohn pueden ser transmurales, incluidas ulceración profunda, edema y fibrosis lo que puede dar lugar a obstrucción y formación de fístulas así como a la formación de abscesos. Esto contrasta con la colitis ulcerosa que normalmente produce lesiones mucho menos profundas, aunque ocasionalmente las complicaciones de fibrosis, obstrucción, formación de fístulas y abscesos se observan también en la colitis ulcerosa.

El tratamiento es similar para ambas enfermedades e incluye esteroides, sulfasalacina y sus derivados, y fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina A, mercaptopurina y azatioprina. Los tratamientos desarrollados más recientemente, algunos aún es ensayos clínicos, implican la administración sistémica (por inyección) de compuesto bloqueantes del TNF tales como anticuerpos de TNF. La publicación *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 45, 2000, 1462-4 divulga la capacidad de la levadura *Saccharomyces boulardii* junto con mesalamina para reducir la incidencia de recidiva clínica en pacientes con la enfermedad de Crohn.

La EII representa un problema serio en la salud pública debido a la ausencia de tratamiento etiológico. Aunque muchos pacientes se controlan con éxito con tratamiento médico convencional, tal como tratamiento con corticosteroides antiinflamatorio, la mayoría tendrá una actividad de la enfermedad recurrente y dos tercios necesitarán cirugía.

Se desconoce la causa de las enfermedades intestinales inflamatorias. Probablemente, la patogénesis de la EC y CU implica una interacción entre factores genéticos y medioambientales, tales como agentes bacterianos, aunque hasta el momento no se ha identificado ningún agente etiológico definitivo. La principal teoría es que en la EII se produce una respuesta inmunitaria anormal, posiblemente provocada por la microflora intestinal. Sin embargo, lo que está bien establecido es que las células T desempeñan un papel importante en la patogénesis. Las células T activadas pueden producir citocinas tanto antiinflamatorias como proinflamatorias. Con este conocimiento en mano, se puede contrarrestar la EII de manera racional. Los tratamientos antiinflamatorios novedosos, que hacen uso de anticuerpos monoclonales neutralizantes o citocinas antiinflamatorias, muestran la posibilidad de modular las desregulaciones inmunitarias causantes de la EII. Un tratamiento nuevo altamente prominente y eficaz es el tratamiento sistémico con anticuerpos monoclonales anti-TNF como se menciona anteriormente. Las dosis intravenosas individuales, que varían de 5 a 20 mg·kg⁻¹, del anticuerpo de cA2 infliximab dieron como resultado una mejora clínica drástica en la enfermedad de Crohn activa. El uso de IL-10 recombinante administrada sistémicamente en un régimen de tratamiento diario de 7 días usando dosis que varían de 0,5 a 25 mg·kg⁻¹ mostró una reducción en las puntuaciones de la actividad de la enfermedad de Crohn y un incremento en la remisión. Actualmente, están emergiendo varios tratamientos muy prometedores a partir de modelos experimentales, que implican citocinas proinflamatorias o bien el establecimiento de infiltrados de células T. Sin embargo, todas estas estrategias requieren una administración sistémica. Las complicaciones graves de la EII pueden ser gravemente debilitantes, y finalmente pueden dar lugar a la muerte.

En la técnica son conocidos varios procedimientos para tratar la EII. En la patente de los EE. UU. 5.368.854, asignada a Schering Corp., se divulga un procedimiento que usa la IL-10 para tratar enfermedades intestinales inflamatorias en mamíferos. En este procedimiento, se administra la citocina a un mamífero que tiene una EII (enfermedad intestinal inflamatoria). La administración de IL-10 como se describen en esta referencia es parenteral, tal como intravascular y preferentemente intravenosa.

Sin embargo, es obvio que dicha vía de administración para un paciente (humano) que padece una EII no está carente de inconvenientes. Una forma más fácil y más conveniente es una administración oral de un medicamento que comprende una citocina, tal como IL-10, o un antagonista de citocina que tiene una actividad terapéutica similar. De forma más importante, la liberación localizada del agente terapéutico permite una mayor eficacia y menos efectos secundarios no deseados debido a las actividades sistémicas.

En el documento WO 97/14806, asignado a Cambridge University Technical Services Ltd., se divulga un procedimiento para la administración de antígenos y/o polipéptidos biológicamente activos usando bacterias no invasivas, tales como *Lactococcus*, por administración intranasal de dichos polipéptidos en el cuerpo, en especial, en la mucosa. El documento WO 00/23471 enseña en detalle cómo se puede tratar la colitis por una cepa de *Lactococcus* que produce citocinas.

Para lograr la recuperación de un paciente que padece una EII, es necesario restablecer las células dañadas y el órgano que comprende dichas células dañadas, por ejemplo, el colon. Varios estudios indican que el efecto curativo de la *Lactococcus* que produce el compuesto antiinflamatorio es debido a la combinación de bacterias el ácido láctico vivas y el compuesto antiinflamatorio, y no al compuesto antiinflamatorio solo. De hecho, tanto Steidler *et al.* (2000), para la IL10, como Vandembroucke *et al.* (2004) en el caso de factores trébol, demuestran claramente que no se obtuvo ningún efecto cuando se mata la *Lactococcus* que produce la IL10 por irradiación UV antes del tratamiento, aunque en estos casos el compuesto activo se debe liberar en el intestino lisando las bacterias.

El tratamiento de colitis con *Lactococcus lactis* que produce IL-10 ha demostrado que es exitoso. Sin embargo, el principal inconveniente es la rápida disminución de la viabilidad de *Lactococcus*, y la escasa supervivencia en el intestino, lo que hace que la dosificación y coordinación precisa del tratamiento sea difícil.

5 Como alternativa para la administración de proteínas o péptidos en el intestino, Blanquet et al. (2004, documento WO 01/98461) describen la posibilidad de administrar proteínas o péptidos en el intestino, usando *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Aunque este sistema puede ser útil en algunos casos, en general se acepta que esta forma de administración puede que no sea exitosa para enfermedades en las que es necesaria una interacción con la mucosa intestinal. De hecho, ya que los autores usaron un sistema de intestino artificial para probar la administración, ellos mismos indicaron que "este sistema no puede estimular los procesos fisiológicos de la pared del intestino, tal como un transporte activo y facilitado". No están disponibles datos sobre la biodisponibilidad o actividad de las moléculas activas (Blanquet et al. 2004). Está bien documentado que, en especial en el caso de IL-10, el microentorno de citocina local producido por los tipos de células que secretan genes es extremadamente importante (Croxford et al., 2001). Varios factores pueden desempeñar un papel, incluidos, pero sin limitación, la composición de la pared celular de la célula que produce citocinas, el tamaño de la célula y la capacidad de la célula para interactuar con la mucosa. Además, existen datos recientes de que los productos metabólicos de levaduras, los antígenos de levaduras y las levaduras son posibles desencadenantes del síndrome de colon irritable (Santelmann y Howard, 2005). Por lo tanto, los resultados obtenidos con las bacterias del ácido láctico no se pueden extrapolar a levaduras sin la debida experimentación, y en vista de las características inmunomoduladoras especiales de *Lactococcus*, el experto en la técnica no esperaría un resultado positivo de la levadura, administrando in situ en el intestino un agente antiinflamatorio tal como IL10, para el tratamiento de colitis.

Sorprendentemente, se ha encontrado que se puede usar la levadura recombinante, que produce un compuesto antiinflamatorio tal como IL10, para el tratamiento de la inflamación de la mucosa, tal como EII o mucositis.

Lo siguiente es la invención de los autores:

- 25 1. Uso de una cepa de levadura recombinante que produce un compuesto antiinflamatorio y/o una cepa de levadura que produce un antagonista de citocinas para la preparación de un medicamento para tratar la inflamación de la mucosa, en el que dicho compuesto antiinflamatorio o antagonista de citocinas se muta para evitar o limitar la glucosilación.
- 30 2. El uso de una levadura recombinante de acuerdo con 1, en el que dicha inflamación de la mucosa es una enfermedad intestinal inflamatoria.
- 35 3. El uso de una cepa de levadura recombinante de acuerdo con 1 o 2, en el que el compuesto antiinflamatorio o antagonista de citocinas se selecciona de la lista que consiste en IL-10, un factor trébol tal como TFF1, TFF2 o TFF3, un antagonista de TNF tal como el receptor de TNF soluble, INCA, ABIN, un antagonista de IL-12, un antagonista de interferón- γ , un antagonista de IL-1 y un análogo de citocina codificado por virus tal como EBV BCRF1.
- 40 4. El uso de una levadura recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicho compuesto antiinflamatorio es IL-10 no glucosilada.
5. El uso de una cepa de levadura recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que la cepa de levadura se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces* sp., *Hansenula* sp., *Kluyveromyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Monascus* sp., *Geotrichum* sp y *Yarrowia* sp.
- 45 6. Uso de una cepa de levadura recombinante de acuerdo con 5, en el que la *Saccharomyces* sp es *Saccharomyces cerevisiae*.
7. Uso de una cepa de levadura recombinante de acuerdo con 6, en el que la cepa de levadura recombinante es la subespecie de *Saccharomyces cerevisiae* *bouardii*.
8. Uso de una cepa de levadura recombinante de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que la enfermedad intestinal inflamatoria es una colitis crónica, enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa.

El compuesto antiinflamatorio que se va a producir por la cepa huésped de levadura puede ser cualquier compuesto antiinflamatorio conocido por el experto en la técnica. De forma alternativa, la levadura puede producir una enzima modificadora, tal como, como ejemplo no limitante, una cinasa, una fosfatasa, una proteasa o una enzima de acetilación, que puede convertir un sustrato en un compuesto antiinflamatorio. Como ejemplo no limitante, dicho compuesto antiinflamatorio puede ser una citocina, tal como IL-10, un antagonista de citocinas (tal como un antagonista de TNF, un antagonista de IL-12, un antagonista de interferón- γ , o un antagonista de IL-1), un polipéptido antiinflamatorio (tal como proteínas trébol, ABIN o INCA), o un análogo de citocinas codificado por virus tal como EBV BCRF1. Los antagonistas de citocinas son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, pero sin limitación, el receptor soluble, y anticuerpos anti-citocinas. Preferentemente, dicho compuesto antiinflamatorio es IL-10.

En el caso de que el compuesto antiinflamatorio comprenda sitios de glucosilación, preferentemente uno o más de estos sitios se mutan para evitar o limitar la glucosilación, preferentemente para evitar o limitar la hiperglucosilación en levaduras. Una realización preferida es una levadura recombinante, que produce IL-10 no glucosilada, preferentemente una IL-10 no glucosilada en la que se han mutado uno o más sitios de glucosilación posibles.

- 5 Preferentemente, el gen o genes que codifican el compuesto antiinflamatorio son genes heterólogos, situados sobre un plásmido. Los plásmidos adecuados son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, pero sin limitación, plásmidos episómicos, cromosomas artificiales o plásmidos integradores.

La levadura recombinante puede ser cualquier levadura que pueda sobrevivir en el intestino de un mamífero. Preferentemente, dicha levadura tiene una capacidad probiótica conocida, tal como cepas de levadura seleccionadas de kéfir, Kombucha o productos lácteos. Aún más preferentemente, dicha levadura recombinante se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces* sp., *Hansenula* sp., *Kluyveromyces* sp. 10 *Schizosaccharomyces* sp. *Zygosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Monascus* sp., *Geotrichum* sp y *Yarrowia* sp. Aún más preferentemente, dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*, lo más preferentemente la subespecie de *Saccharomyces cerevisiae boulardii*. Preferentemente, el sistema vector - huésped de levadura recombinante es un sistema contenido biológicamente. La contención biológica es conocida para el experto en la técnica y se puede 15 realizar por la introducción de una mutación auxotrófica, preferentemente una mutación auxotrófica suicida tal como la mutación Thy A, o sus equivalentes. De forma alternativa, la contención biológica se puede realizar en el nivel del plásmido que porta el gen que codifica el compuesto antiinflamatorio. Esto se puede realizar, como ejemplo no limitante, usando una construcción episómica inestable, que se pierde después de unas pocas generaciones.

- 20 Se pueden combinar varios niveles de contención, tales como inestabilidad de plásmido y auxotrofia, para garantizar un alto nivel de contención.

Preferentemente, la inflamación de la mucosa es la EII. Las enfermedades intestinales inflamatorias tales como una colitis crónica, la enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa, se pueden tratar de acuerdo con la invención con una dosificación apropiada del compuesto antiinflamatorio activo, preferentemente IL-10, aún más preferentemente IL-10 25 no glucosilada y proporciona inesperadamente un restablecimiento del colon enfermo a un estado aparentemente normal y sano.

De forma alternativa, se puede usar la administración de un compuesto antiinflamatorio tal como IL-10 por levadura recombinante para tratar otras inflamaciones de la mucosa tales como mucositis.

La IL-10 se puede administrar sola o en combinación con al menos un agente terapéutico adicional. Ejemplos de 30 dichos agentes incluyen corticosteroides; sulfasalacina, derivados de sulfasalacina, fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina A, mercaptopurina, azatioprina y otra citocina. La administración conjunta puede ser secuencial o simultánea. En general, administración conjunta quiere decir que los múltiples (dos o más) productos terapéuticos están presentes en el receptor durante un intervalo de tiempo específico. Típicamente, si se administra un segundo agente dentro de la semivida del primer agente, los dos agentes se consideran administrados 35 conjuntamente. El otro agente terapéutico, como se menciona aquí, puede ser otro sistema de administración microbiano tal como *Lactococcus* o una cepa de levadura, que administra otro compuesto, preferentemente un compuesto con una acción complementaria tal como, como ejemplo no limitante, un factor trébol.

Por tanto, la invención divulgada en el presente documento se refiere a una administración localizada de IL-10 a través de la síntesis in situ por levadura recombinante. Como resultado de la misma, se reduce la inflamación en al 40 menos un 30%, en colitis crónica inducida con DSS y evita la aparición de colitis en ratones 129 Sv/Ev IL-10 -/-. De este modo, el procedimiento es igualmente eficaz en comparación con los tratamientos potentes, bien establecidos y aceptados que se basan en la administración sistemática de proteínas antiinflamatorias.

El vector de levadura usado en el presente documento se selecciona de alimento, preferentemente alimento con características probióticas, o de probióticos conocidos y es totalmente inocuo para individuos inmunocompetentes. 45 Especialmente en el caso de la subespecie de *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, está disponible experiencia clínica, y se ha estudiado el tiempo en tránsito en el intestino. La dosificación y coordinación precisa durante el tratamiento, que se ha demostrado aquí que es de gran importancia, se puede obtener así fácilmente.

El requisito crítico para la viabilidad del vector se muestra en la presente invención. Esto indica la necesidad de una síntesis in situ de IL-10. De hecho, el vector puede lograr esto mostrando la síntesis *de novo* de IL-10 en el colon. La 50 levadura, de acuerdo con la invención, tiene en este respecto una clara ventaja sobre *Lactococcus lactis* como se describe en el documento WO 00/23471, ya que mantiene su viabilidad más fácilmente durante el proceso, y sobrevive mejor en el intestino que *Lactococcus*.

Este procedimiento puede contestar la cuestión de la presencia sostenida y localizada de IL-10 en tratamiento a 55 concentraciones mayores de lo que se puede desear o incluso lograr a través de la administración sistémica, con respecto a los efectos secundario latentes.

Definiciones

Algunos términos usados en la presente descripción, en aras de la claridad, se explican a continuación en el presente documento. En general, el término "*síntomas*" se refiere a cualquier evidencia subjetiva de enfermedad o de una afección de un paciente. Esto incluye evidencia como se percibe por el paciente. Ejemplos de síntomas de EII incluyen diarrea, dolor abdominal, fiebre, melena, hematoquecia y pérdida de peso.

El término "*signos*" se refiere, en general, a cualquier evidencia objetiva de una enfermedad o afección, normalmente como se percibe por el médico que examina o características que se revelan en una evaluación en laboratorio u otras pruebas tales como un estudio de ultrasonidos o una prueba radiográfica. Algunos ejemplos de signos de EII incluyen masa abdominal, glositis, úlcera aftosa, fisura anal, fístula perianal, anemia, malabsorción y deficiencia de hierro. Ocasionalmente, los signos y los síntomas coinciden. Por ejemplo, el paciente se queja de heces con sangre (un síntoma), y una prueba de laboratorio de una muestra de heces es positiva para sangre (un signo).

La expresión "*dosificación apropiada*" o "*cantidad eficaz*" quiere decir una cantidad o dosificación suficiente para mejorar un síntoma o signo de una afección autoinmunitaria o de una respuesta inmunitaria o inflamatoria no deseada o inapropiada. Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se trata, la salud general del paciente, la ruta del procedimiento y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios.

Por "*citocina*" se quiere decir un factor polipeptídico producido de forma transitoria por una variedad de tipos de células, que normalmente actúa localmente y activa la expresión de genes específicos por la unión a los receptores de la superficie celular.

Por "*antagonista*" se quiere decir un compuesto que se une pero que no activa los receptores, por lo tanto inhibe la acción de un agonista de forma competitiva.

Los "*agonistas*" son compuestos que se unen a y activan receptores (por ejemplo, ligandos endógenos tales como hormonas y neurotransmisores, compuestos sintetizados químicamente, productos naturales como alcaloides).

"*Compuesto*" quiere decir cualquier compuesto químico o biológico, incluidos moléculas orgánicas e inorgánicas sencillas o complejas, péptidos, péptidos miméticos, proteínas, anticuerpos, carbohidratos, ácidos nucleicos o derivados de los mismos.

Los términos "*proteína*" y "*polipéptido*" como se usan en esta solicitud, son intercambiables. "*Polipéptido*" se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica de la molécula. Este término también incluye modificaciones postraduccionales del polipéptido, tal como glucosilación, fosforilación y acetilación.

30 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Mapa del plásmido de pPIC92MIL10

Figura 2: Mapa del plásmido del vector pYES2

Figura 3: Mapa del plásmido de pYES2-mIL10

Figura 4: Construcción del fragmento TPI-ppMF-mIL10 por PCR de superposición. Los números indican los cebadores usados (véase el texto).

Figura 5: Mapa del plásmido de pYES2T-mIL10

Figura 6: secreción de mIL10 por INV S.c.1 [pYES2] de *Saccharomyces cerevisiae* y INV S.c.1 [pYES2T-mIL10] de *Saccharomyces cerevisiae* determinado por ELISA sándwich en función del tiempo (después de 0, 8, 12, 24 y 48 horas). Figura 7: Detección de transferencia Western de mIL10. La señal corresponde a la cantidad de proteína presente en 0,5 ml de sobrenadante de cultivo después de 24 horas de crecimiento en YPD.

Figura 8: Detección de transferencia Western de mIL10 y mIL-10 no glucosilado. La señal corresponde a la cantidad de proteína presente en 0,5 ml de sobrenadante de cultivo después de 24 horas de crecimiento en YPD.

Figura 9: Evaluación estadística de la puntuación histológica del colon distal. Todos los datos se expresan como media \pm EEM. Los datos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza con 1 factor (ANOVA) seguido de múltiples comparaciones postprueba de la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher. * representa una diferencia estadísticamente significativa en comparación con grupos de control tratados con vector de *Saccharomyces cerevisiae* y de prueba de $P < 0,035$ y $P < 0,012$, respectivamente, ⁺a representa una diferencia estadística en comparación con grupos de control tratados con vector de *Lactococcus lactis* y de prueba de $P < 0,085$ y $P < 0,152$, respectivamente.

Figura 10: Sustitución génica de P_{URA3}-URA3 por P_{TPI}ppMF-mIL10ng1S en VC5 de *Saccharomyces cerevisiae*. Los números (1-8) indican los diferentes cebadores usados.

Figura 11: Organización genómica de la región de 108 504 - 120 299 pb del cromosoma V de *Saccharomyces cerevisiae* (Dietrich *et al.*, 1997); YEL023C y YEL020C son genes con una función desconocida; GEA2 codifica el factor de intercambio nucleotídico de guanina 2 del factor de ribosilación de ADP (ARF); URA3 codifica orotidin-5'-fosfato (OMP) descarboxilasa; TIM9 codifica la proteína de la membrana interna mitocondrial que es responsable de la importación e inserción de proteínas polipépticas de la membrana interna.

Figura 12: Detección de transferencia Western de mIL10. La señal corresponde a la cantidad de proteína presente en 0,5 ml de sobrenadante de cultivo después de 24 horas de crecimiento en YPD.

Ejemplos

Materiales y procedimientos para los ejemplos

10 Cepas y medio de cultivo

Se obtuvo INV Sc1 de *Saccharomyces cerevisiae* (apareamiento- α , his3 Δ 1, leu2-3,-112 trp1-289 y ura3-52) de Invitrogen™.

Se aisló la subespecie *boulardii* de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de una preparación probiótica comercial.

15 El medio mínimo fue SD+CSM-U, que consistía en base de nitrógeno para levadura al 0,67% sin aminoácidos (Difco, Detroit, MI) dextrosa al 2% (Merck, Darmstadt, Alemania) y CSM-URA al 0,077% (Bio101 Systems, Morgan Irvine, CA).

El medio YPD consiste en extracto de levadura al 1%, Difco; dextrosa al 2%, Merck; peptona al 2%, Difco.

Técnicas de ADN recombinante.

20 Se realizó la amplificación de PCR del ADN con polimerasa VENT y se usaron las condiciones recomendadas por el fabricante. Se usaron enzimas modificadoras de ADN y endonucleasas de restricción bajo condiciones estándar y en los tampones recomendados por los fabricantes. Se llevaron a cabo técnicas de clonación molecular general y la electroforesis de ADN y proteínas esencialmente como se describe (Sambrook *et al.*, 1990). Se transformó *S. cerevisiae* por electroporación y se seleccionaron los transformantes sobre el medio selectivo adecuado como se indica.

25 Construcción de los plásmidos de expresión.

Subclonación de mIL10 en el plásmido pPIC92

30 Se amplificó por PCR la secuencia codificante de ADN de mIL10 maduro (polimerasa Vent®, NEB, Ipswich, MA) con oligo mIL10 S (CAGTACAGCCGGAAGACAAT) y oligo mIL10 AS (GCACTAGTTAGCTTTTCATTTTGAT) del plásmido pT1mIL10 (Schotte *et al.*, 2000). Esto dio como resultado un fragmento de 474 pb. Se ligó este fragmento de PCR de mIL10 en marco después de la señal de secreción del factor de apareamiento- α de prepro (ppMF) de *Saccharomyces cerevisiae* presente en el plásmido pPIC92 que se linealizó con la enzima de restricción de NaeI (NEB). Se designó la construcción resultante como pPIC92mIL10 (figura 1). Se derivó el plásmido pPIC92 del plásmido pPIC9K (Invitrogen™, Carlsbad, CA). Se transformaron células competentes en calor de MC1061 de *Escherichia coli* con la mezcla de ligación pPIC92mIL10.

35 Subclonación de ppMF-mIL10 en el plásmido pYES2

40 pYES2 (figura 2; Invitrogen) es un vector de 5,9 kb diseñado para la expresión inducible de proteínas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae*. Las características del vector permiten una fácil clonación del gen de interés y la selección de transformantes por prototrofia del uracilo (contiene el marcador URA3). El vector pYES2 se designa para una expresión de alto nivel de proteínas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae*. Contiene el promotor GAL1 que permite la expresión inducible de galactosa. El vector lleva el origen de replicación 2 μ y se mantiene de forma episómica en un alto número de copias (10-40 copias por célula). El vector también contiene el origen de pUC de *E. coli* y resistencia a ampicilina que permite la fácil clonación y selección en *E. coli*.

45 Se digirió el vector pYES2 con una digestión combinada de BamHI (NEB) y XbaI (NEB). Se aisló el fragmento de ADN del vector de 5780 pb. Se digirió el pPIC92mIL10 de plásmido con una digestión combinada de BamHI (NEB) y SpeI (NEB). Se aisló el fragmento de ADN de 751 pb. Se ligaron las dos bandas de ADN seleccionadas (5780 y 751 pb) y se transformaron en células competentes en calor de MC1061 de *E. coli*. Se designó el plásmido construido como pYES2-mIL10 (figura 3).

Construcción del plásmido pYES2T-mIL10

50 El plásmido construido previamente pYES2-mIL10 tenía la desventaja de que sólo produce secreción de mIL10 después de la inducción con galactosa del promotor GAL1. Para el uso *in vivo* de cepas de *Saccharomyces* que secretan mIL10, es muy importante que secreten de forma constitutiva mIL10. Para lograr este objetivo, se sustituyó

el promotor GAL1 por la triosa fosfato isomerasa constitutiva y muy fuerte (promotor TPI). Se subclonó el casete de expresión ppMF-mIL10 bajo el control del promotor TPI constitutivo y fuerte en un alto número de copias del plásmido de *Saccharomyces cerevisiae* (origen 2 μ).

5 Se amplificó por PCR el fragmento TPI-ppMF' con oligo Spel-TPI-S (oligo N.º 1 en la figura 4; GCACTAGTATC-CGAGATTATATCTAGGAACCCATCAGG) y oligo antisentido ppMF-medio-AS (oligo N.º 2 en la figura 4A; CT-TCTAAATCTGAGTAACCGATGACAGCTTC) a partir del plásmido pSCTPIMF3. Esto dio como resultado la PCR de TPI-ppMF' que tiene una longitud de 500 pb.

10 Se amplificó el fragmento de PCR ppMF-mIL10 con el oligo ppMF-inicio-S (oligo N.º 3 en la figura 4A; ATGA-GATTCCTTCAATTTTTACTGCAG) y el oligo mIL10-EcoRI-medio-AS (oligo N.º 4 en la figura 4A; CAGGGAAT-TCAAATGCTCCTTGATTCTGG) a partir del plásmido construido previamente pPIC92mIL10. El fragmento de PCR resultante ppMF-mIL10 tenía una longitud de 525 pb.

15 Se usaron el fragmento TPI-ppMF' y ppMF-mIL10 como plantilla en una PCR de superposición con los oligos exteriores de las dos reacciones de PCR previas: oligo Spel-TPI-S (oligo N.º 1 en la figura 4B; GCACTAGTATCCGAGATTATATCTAG- GAACCCATCAGG) y oligo mIL10-EcoRI-medio-AS (oligo N.º 4 en la figura 4B; CAGGGAATTCAAATGCTCCTT- GATTCTGG). El fragmento de PCR Spel-TPI-ppMF-mIL10-EcoRI ensamblado (figura 4B) tenía una longitud de 989 pb y se purificó en un gel de agarosa y se digirió por las enzimas de restricción Spel y EcoRI.

20 Se digirió el vector construido previamente pYES2-mIL10 por Spel y EcoRI. Se aisló el fragmento de ADN de 5466 pb y se ligó con el fragmento de PCR Spe/-TPI-ppMF-mIL10-EcoRI. Esto dio como resultado un plásmido que se designó como pYES2T-mIL10 (figura 5). Se transformaron células de *E. coli* MC1061 competentes en calor con la mezcla de ligación pYES2T-mIL10.

Animales

25 Se obtuvieron ratones BALB/c hembras de 11 semanas de edad de los laboratorios Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania). Se alojaron bajo condiciones SPF. Se alimentaron todos los ratones con pienso de laboratorio estándar y agua corriente *ad libitum*. Se aprobaron los estudios en animales por el Comité ético del Departamento de Investigación biomédica molecular, Ghent University (N. expediente 04/02).

Inducción de colitis crónica por DSS

30 Se indujo colitis crónica a los ratones que pesaban aproximadamente 21 g por cuatro ciclos de administración de DSS al 5% (p/v) (40 kDa, Applichem, Darmstadt, Alemania) en el agua de bebida, alternando con periodos de 10 días de recuperación con agua de bebida normal. (Okayasu *et al.*, 1990; Kojouharoff *et al.*, 1997). Se inició de forma arbitraria el tratamiento el día 21 después del cuarto ciclo de DSS. Se trataron los diferentes grupos durante 14 días. 14 días después del último tratamiento, se mataron los ratones y se analizaron.

Análisis estadístico

35 Todos los datos se expresan como media \pm EEM. Los datos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza con 1 factor (ANOVA) seguido de múltiples comparaciones postprueba de la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher.

Control de *Lactococcus*

Se llevó a cabo el tratamiento con *Lactococcus* que secreta IL-10 como se describe por Steidler *et al.* (2000).

Ejemplo 1: Construcción de cepas de *Saccharomyces* que secretan mIL10

40 Se sometió a electroporación 1 μ g del plásmido pYES2T-mIL10 (preparado por el kit de plásmido midi de Qiagen, Hilden, Alemania; fuera de la cepa de *E. coli* MC1061[pYES2T-mIL10]) en células INV Sc1 de *Saccharomyces cerevisiae* electrocompetentes. Se plaquearon las células de levadura transformadas en medio mínimo deficiente de uracilo (selección). El cribado por PCR identificó los transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* en los que estaba presente el plásmido pYES2T-mIL10. Estos se designaron como INV Sc1[pYES2T-mIL10] de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ejemplo 2: Secreción de mIL10 por *Saccharomyces cerevisiae*.

50 Se inocularon respectivamente una colonia de cepas de *Saccharomyces* de INV Sc1[pYES2T-mIL10] de *Saccharomyces cerevisiae* el vector de control INV Sc1 [pYES2] de *Saccharomyces cerevisiae* en 50 ml de medio deficiente en uracilo mínimo (SD+CSM-U). Después de 24 horas de crecimiento aeróbico a 30°C, se sedimentaron las células por centrifugación (5 minutos a 2500 tpm) y no se concentró (2×10^8 CFU/ml) o se concentró 2 x en medio YPD. En diferentes puntos temporales (8, 12, 24 y 48 horas), se tomaron muestras de sobrenadante para la cuantificación y caracterización de mIL10. Durante las 48 horas de crecimiento, el pH del sobrenadante de *Saccharomyces cerevisiae* permaneció estable a 7.

Se estableció un ELISA tipo sándwich para evaluar la cantidad de IL-10 murina secretada en el sobrenadante de cultivo. Se usó IL-10 anti murina de conejo policlonal ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$; Prepro Tech, Londres, Inglaterra) como anticuerpo de captura. Se aplicó un anticuerpo acoplado a biotina, monoclonal, contra la IL-10 murina (Pharmingen, San Diego, EE. UU.) a una dilución de 1/1000 para detectar la IL-10 capturada. Se hicieron reaccionar los complejos biotinilados con estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante (Pharmingen) a una dilución de 1/1000 y se revelaron por reacción con sustrato TMB (Pharmingen). Entre las etapas, se lavaron las placas de microtitulación dos veces con agua y una vez con PBS, que contenía Triton X-100 al 0,05% (Sigma). Para evitar la unión no específica, se incubaron las placas en PBS que contenía caseína al 0,1%.

Después de 12 horas de crecimiento, la cepa de INV Sc1 [pYES2T-mIL10] de *Saccharomyces cerevisiae* había secretado $0,8 \pm 0,0 \mu\text{g/ml}$ de mIL10 cuando las células se concentraron 1 x y $1,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ de mIL10 cuando las células se concentraron 2 x (figura 6). Después de 24 horas de crecimiento, la cepa de INV Sc1 [pYES2T-mIL10] de *Saccharomyces cerevisiae* había secretado $2,8 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ de mIL10 cuando las células se concentraron 1 x y $6,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ de mIL10 cuando las células se concentraron 2 x (figura 6). Y finalmente, después de 48 horas de crecimiento, la cepa INV Sc1 [pYES2T-mIL10] de *Saccharomyces cerevisiae* había secretado $5,0 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ de mIL10 cuando las células se concentraron 1 x y $10,2 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ de mIL10 cuando las células se concentraron 2 x (figura 6). El vector vacío de control de INV Sc1 [pYES2T-mIL10] de *Saccharomyces cerevisiae* no mostró producción de mIL10 en ningún punto temporal (figura 6).

Se extrajeron proteínas del sobrenadante de cultivo por precipitación de TCA y posteriormente se disolvieron en tampón de muestra de Laemmli (Laemmli, 1970). Se separaron las fracciones de proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se sometió a electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Burnette, 1981).

Se detectó la interleucina-10 murina por inmunotransferencia con IL-10 anti murina de conejo policlonal como anticuerpo principal a una dilución de 1/1000 (Prepro Tech, Londres, Reino Unido). El anticuerpo secundario fue IgG anti ratón de cabra (H+L) acoplado a fosfatasa alcalina (SBA, Birmingham, EE. UU.) y se usó a una dilución de 1/1000. Se reveló la actividad enzimática con sustrato NBT/BCIP (Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania). La figura 7 muestra la detección de mIL10 en el sobrenadante de INV S.c.1 de *Saccharomyces cerevisiae* por transferencia Western después de 24 horas de crecimiento. Se concentraron 1 x o 2 x respectivamente las células de *Saccharomyces* en YPD durante las 24 horas de crecimiento.

Se sometió a prueba la actividad biológica de la IL-10 recombinante, secretada por *Saccharomyces*, en un ensayo de proliferación con la línea celular de mastocitos de ratón MC/9. Se determinó la titulación biológica de IL-10 a partir de la estimulación de la incorporación de [^3H]timidina por las células de mastocitos en proliferación. Se usó un estándar de actividad específica conocida (BioSource International, Camarillo, CA) como control interno.

Ejemplo 3: Producción de IL10 murina no glucosilada

Puesto que la glucosilación puede afectar a la actividad de la IL-10 secretada, que quiso generar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que secreta interleucina-10 murina no glucosilada. La mIL10 contiene dos sitios de N-glucosilación de *Saccharomyces cerevisiae* potenciales (secuencia consenso N-X-S/T, los sitios de glucosilación potenciales se indican en negrita):

QYSREDNNCTHFPVQGSHMLLELR TAFS QVKTFFQT KDQLDNILLTDSL MQDFKGYLG CQAL

SEMIQFYLV EVM PQA EK HGP EIKEHLNSLGEK LKTLRMRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVK SDF

NKLQDQGVYKAMNEFDIFIN CIEAYMMIKMKS

El sitio 11-NCT-19 está situado en un bucle que está orientado hacia el disolvente. El sitio no parece estar implicado en la interacción con el receptor IL-10. Este sitio de reconocimiento no está conservado en (h)IL10 humana. En la hIL10, la secuencia de aminoácidos es 11-SCT-13. El sitio de 11-NCT-13 parece que es un sitio de glucosilación ideal para *Saccharomyces cerevisiae*. Se puede retirar este sitio de glucosilación de mIL10 mutando 11-NCT-13 a 11-SCT-13 como en la hIL10 o a 11-QCT-13 (Q es un aminoácido que se semeja mucho estructuralmente a N; las mutaciones se indican en negrita). Se realizaron ambas mutaciones de mIL10.

El sitio 116-NKS-118 parece que es importante para la estabilización y la estructura de mIL10. N así como S están implicados en la formación del enlace de H con el esqueleto de residuos cercanos. La secuencia de aminoácidos de este sitio se conserva estrictamente en seres humanos y en todos los demás homólogos conocidos de IL10. El programa GlyProt no reconoce este sitio como un sitio de glucosilación potencial. En la hIL10 se conserva este sitio y no está glucosilado (Vieira et al., 1991). Esto sugiere que el sitio de 116-NKS-118 tampoco está glucosilado en la IL10 murina. No obstante, se realizó la mutación del sitio 116-NKS-118 en 116-QKS-118 para someter a prueba posibles efectos.

En total, se realizaron cuatro construcciones diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* que secretan 4 formas mutantes (no glucosiladas) diferentes de mIL10. Se mutan dos construcciones en el primer sitio de glucosilación que se muta respectivamente a S y Q. Además, se realizaron 2 construcciones en las que se mutó el primer sitio de

glucosilación respectivamente a S y Q y se muta el segundo sitio de glucosilación a Q.

En el mutante mIL10ng1S sólo se muta el primer sitio de glucosilación potencial. Se muta la secuencia de 11-NCT-13 a 11-SCT-13.

5 En el mutante mIL10ng1Q sólo se muta el primer sitio de glucosilación potencial. Se muta la secuencia de 11-NCT-13 a 11-QCT-13.

En el mutante mIL10ng1S2Q se mutan ambos sitios de glucosilación potenciales primero (11-NCT-13) y segundo (116-NKS-118). Se muta el primer sitio de glucosilación potencial 11-NCT-13 a 11-SCT-13. Se muta el segundo sitio de glucosilación potencial 116-NKS-118 a 116-QKS-118.

10 En el mutante mIL10ng1Q2Q se mutan los sitios de glucosilación potenciales primero (11-NCT-13) y segundo (116-QKS-118). Se muta el primer sitio de glucosilación potencial 11-NCT-13 a 11-QCT-13. Se muta el segundo sitio de glucosilación potencial 116-NKS-118 a 116-QKS-118. Se subclonan los mutantes mIL10ng1S, mIL10ng1Q, mIL10ng1S2Q y mIL10ng1Q2Q mIL10 en pYES2T-ppMF para generar respectivamente los plásmidos pYES2T-mIL10ng1S, pYES2Tng1Q, pYES2T-mIL10ng1S2Q y pYES2T-mIL101Q2Q. Se introdujeron estos plásmidos en la cepa INV S.c.1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Se inocularon una colonia de todos los transformantes y el vector de control de INV Sc1[pYES2] de *Saccharomyces cerevisiae* en 50 ml de medio deficiente en uracilo mínimo (SD+CSM-U). Después de 24 horas de crecimiento aeróbico a 30°C, se sedimentaron las células por centrifugación (5 minutos a 2500 rpm) y se resuspendieron en medio YPD. A las 24 horas, se tomaron muestras del sobrenadante para la cuantificación y caracterización de mIL10. Durante las 48 horas de crecimiento, el pH del sobrenadante de *Saccharomyces cerevisiae* permaneció estable a pH 7.

20 Se extrajeron proteínas del sobrenadante de cultivo por precipitación de TCA y posteriormente se disolvieron en tampón de muestra de Laemmli (Laemmli 1970). Se separaron fracciones de proteína por SDS-PAGE y se sometió a electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Burnette 1981).

25 Se detectó la interleucina-10 murina con una IL-10 anti murina de conejo policlonal como anticuerpo principal a una dilución de 1/1000 (Prepro Tech, Londres, Reino Unido). El anticuerpo secundario fue IgG anti ratón de cabra (H+L) acoplado a fosfatasa alcalina (SBA, Birmingham, EE. UU.) y se usó a una dilución de 1/1000. Se reveló la actividad enzimática con sustrato NBT/BCIP (Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania). La figura 8 muestra la detección de mIL10 en el sobrenadante de diferentes cepas de INV S.c.1 de *Saccharomyces cerevisiae* por transferencia Western después de 24 horas de crecimiento en YPD. Cambiando el sitio de glucosilación de mIL10 de *Saccharomyces* 11-NCT-13 a 11-SCT-13 (como en hIL10), se pudo eliminar la hiperglucosilación de mIL10 por *Saccharomyces*. La retirada del primer sitio de glucosilación potencial (11-SCT-13) fue suficiente para evitar la glucosilación de mIL10. La retirada del segundo sitio de glucosilación 116-NKS-118 a 116-QKS-118 no proporcionó ningún beneficio. En experimentos de estudio en animales, se usaron la forma de mIL10 natural y la forma mIL10ng1S donde el primer sitio de glucosilación potencial está humanizado a 11-SCT-13.

35 Ejemplo 4: Tratamiento de colitis de DSS crónica con *S. cerevisiae* viva que secreta mIL10ng1 S de forma inducida por plásmido

Se evaluó la eficacia terapéutica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que secretan mIL10 para el tratamiento de colitis crónica en el modelo de ratón inducido por dextranosulfato de sodio (DSS).

40 Se indujo colitis crónica a los ratones por DSS como se describe (Okayasu *et al.*, 1990; Kojouharoff *et al.*, 1997) El tratamiento diario durante 14 días con 2×10^8 CFU de transformantes de INV Sc1 de *Saccharomyces cerevisiae* que secretan la forma no glucosilada de mIL10 ($n = 10$; S.c. mIL10ng1S) dio como resultado una puntuación histológica menor significativa del colon distal en comparación con los grupos tratados con vector de control de *Saccharomyces cerevisiae* ($n = 10$) y con prueba ($n = 10$) (figura 9). La eficacia del tratamiento de S.c. mIL10ng1S contra colitis de DSS crónica establecida era comparable con la observada con el tratamiento diario durante 14 días con 2×10^9 CFU de *L. lactis* que secreta mIL10 ($n = 10$; LL-mIL10; figura 9). La forma no glucosilada de mIL10 (mIL10ng1S) que se secretó por *Saccharomyces cerevisiae* obtuvo mejores resultados que la forma glucosilada con respecto a la eficacia terapéutica (figura 9).

Ejemplo 5: Construcción de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que secreta mIL10ng1S contenida biológicamente modificada genéticamente (MG)

50 Para lograr una secreción estable de una proteína terapéutica por *Saccharomyces cerevisiae*, es importante que el casete de expresión de proteína está integrado genómicamente. Bajo circunstancias no selectivas, *Saccharomyces cerevisiae* perderá rápidamente su plásmido que expresa el gen terapéutico incriminatorio y no esencial y el ADN del gen recombinante se extenderá a la naturaleza, lo que es altamente indeseable. También es importante crear una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* MG que esté contenida biológicamente y, por tanto, que no pueda sobrevivir en el entorno. Por lo tanto, se usó una cepa de laboratorio haploide estéril (*ste*) que es auxótrofa (Botstein *et al.*, 1979). Las cepas de levadura auxótrofas sólo pueden sobrevivir en medio rico. En medio mínimo o en el entorno, estas

cepas de levadura sufren una detención en el crecimiento después de lo cual mueren. Una cepa de levadura auxótrofa, haploide, que también es estéril (*ste*) no puede transferir el ADN del gen terapéutico a otra cepa de levadura. Se usó la cepa VC5 de Meyen ex E.C. Hansen de *Saccharomyces cerevisiae* haploide y estéril (MATA, *ste*) (Mackay *et al.*, 1974a; Mackay *et al.*, 1974b) para secretar mL10. El gen URA3 esencial y el promotor se intercambiarán por recombinación homóloga por el gen mL10ng1S, precedido de un promotor TPI fuerte y constitutivo (figura 10).

Se substituyó el gen orotidin-5'fosfato (OMP) descarboxilasa (URA3) completo (figura 11) que incluye el promotor URA3 por el promotor TPI constitutivo y fuerte, seguido del fragmento de ADN ppMF-mL10ng1S. En el fragmento de ADN ppMF-mL10ng1S, el primer sitio de glucosilación está humanizado, lo que elude el problema de hiperglucosilación por *Saccharomyces cerevisiae*, y se fusiona en marco a la señal de secreción de ppMF

Por la sustitución de P_{URA3}-URA3 por P_{TPI}-ppMF-mL10ng1S, se creó una cepa auxótrofa *ura3*. En ausencia de uracilo, esta cepa sufre una detención en el crecimiento y muere. El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* está completamente secuenciado y hecho público (Dietrich *et al.*, 1997). En base a la secuencia de ADN de la región URA3 se desarrollaron oligos (oligo 1 = 5'URA3P-TPI-S,

TTTTGACCATCAAAGAAGGTTAATGTGGCTGTGGTTTCAGGGTCCATAGATTTCCCTTCAAT

TTTTACTGCAG

y oligo 2 = mL10-3'URA3-AS,

CTAATTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTTTAGCTTTTCATTTTG ATCATCATGTATGC en la figura 10A) que permitieron la amplificación del casete de expresión PTPI-ppMF-hIL10 con la adición en el extremo del cebador 5' y 3' del producto de PCR de respectivamente 50 nucleótidos (nt) de las regiones flanqueantes 5' y 3' de P_{URA3}-URA3 (10B). Se introdujo este fragmento de PCR en células de VC5 de *Saccharomyces cerevisiae* hechas competentes con LiOAc/PEG (Schiestl *et al.*, 1989; Gietz *et al.*, 2001). Las regiones homólogas de 50 nt del fragmento de PCR con la región P_{URA3}-URA3 permiten la recombinación homóloga y la sustitución del fragmento P_{URA3}-URA3 con el casete de expresión PTPI-ppMF-hIL10. Plaqueando las levaduras en medio mínimo que contiene ácido 5-fluoroorótico (5-FO), sólo pueden sobrevivir las levaduras que han substituido P_{URA3}-URA3 por P_{TPI}-ppMF-mL10ng1S (URA3 transforma 5-FO a 5-fluorouracilo tóxico). Se investigaron adicionalmente las colonias por cribado de PCR en presencia de P_{TPI}-ppMF-mL10ng1S (oligo 5-6 y oligo 7-8; figura 10C) y en ausencia de P_{URA3}-URA3 (oligo 3-4 op 10B) (Oligo 3 = URA3-S, TGCTGCTACTCATCCTAGTC; oligo 4 = URA3-AS, TCATCTCTTCCACCCATGTC; oligo 5 = 5'URA3 flanqueante-S, ATTGAGGGCGGATTACTACC; oligo 6 = mL10AS, AG- GAGTCGGTTAGCAGTATG; oligo 7 = mL10-S, GCAGTGGAGCAGGTGAAGAG; oligo 8= 3'URA3 flanqueante-AS, CG- GTTGTCCGTTTGACTTG).

Se verificó la ausencia de crecimiento de la cepa VC5 *ste ura3*- mL 10+ de *Saccharomyces cerevisiae* construida en medio mínimo sin uracilo usando un turbidímetro automatizado (Bioscreen). El crecimiento fue normal en medio rico.

Se inocularon una colonia de cepas *Saccharomyces* de VC5 *ste ura3*⁻ mL10ng1S+ de *Saccharomyces cerevisiae* y el vector de control de VC5 *ste ura3*⁻ de *Saccharomyces cerevisiae* en 50 ml de YPD. Después de 24 horas de crecimiento aeróbico a 30°C, se sedimentaron las células por centrifugación (5 minutos a 2500 tpm) y se resuspendieron en medio YPD recién preparado. Después de otras 24 horas, se tomaron muestras del sobrenadante para la cuantificación y caracterización de mL10. Durante las 48 horas de crecimiento, el pH del sobrenadante de *Saccharomyces cerevisiae* permaneció estable a pH 7. Se extrajeron proteínas del sobrenadante de cultivo por precipitación de TCA y posteriormente se disolvieron en tampón de muestra de Laemmli (Laemmli 1970). Se separaron fracciones de proteína por SDS-PAGE y se sometió a electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Burnette 1981). Se detectó la interleucina-10 murina con una IL-10 anti murina de conejo policlonal como anticuerpo principal a una dilución de 1/1000 (Prepro Tech, Londres, Reino Unido). Como anticuerpo secundario se usó IgG anti conejo de cabra (H+L) acoplada a fosfatasa alcalina (SBA, Birmingham, EE. UU.), a una dilución de 1/1000. Se reveló la actividad enzimática con sustrato NBT/BCIP (Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania).

La figura 12 muestra la detección de mL10 en el sobrenadante de los clones VC5 *ura3 ste* mL10ng1S de *Saccharomyces cerevisiae*. Se usó MG1363[pT1mL10] de *L. lactis* como control positivo. A partir de la figura se puede concluir que los clones de VC5 *ura3 ste* mL10ng1S de *Saccharomyces cerevisiae* contenidos biológicamente MG construidos secretan eficazmente mL10 en el sobrenadante y se pueden usar para la producción de IL-10 in vivo y el tratamiento de EII.

Referencias

- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal Biochem.* 122, 195-203.
- 5 - Blanquet, S., Antonelli, R., Laforet, L., Denis, S., Marol-Bonnin, S. y Alric, M. (2004). Living recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting proteins and peptides as a new drug delivery system in the gut. *J. Biotechnol.* 110, 37-49.
- Botstein, D, SC Falco, SE Stewart, M Brennan, S Scherer, DT Stinchcomb, K Struhl y RW Davis (1979). "Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments." *Gene* 8(1): 17-24.
- 10 - Croxford, J.L., Feldmann, M., Chernajovsky, Y. y Baker, D. (2001). Different therapeutic outcomes in experimental allergic encephalomyelitis dependant upon the mode of delivery of IL-10: a comparison of the effects of protein, adenoviral or retroviral IL-10 delivery into the central nervous system. *J. Immunol.* 166, 4124-4130.
- Dietrich, FS, J Mulligan, K Hennessy, MA Yelton, E Allen, R Araujo, E Aviles, A Berno, T Brennan, J Carpenter, E Chen, JM Cherry, E Chung, M Duncan, E Guzman, G Hartzell, S Hunicke-Smith, RW Hyman, A Kayser, C Komp, D Lashkari, H Lew, D Lin, D Mosedale, RW Davis y et al. (1997). "The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome V." *Nature* 387(6632 Supl.): 78-81.
- 15 - Gietz, RD y RA Woods (2001). "Genetic transformation of yeast." *Biotechniques* 30: 816-20, 822-6, 828 passim.
- Kojouharoff, G., Hans, W., Obermeier, F., Mannel, D.N., Andus, T., Scholmerich, J. Gross, V., y Falk, W. (1997). Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 107, 353-358.
- 20 - Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Mackay, V y TR Manney (1974a). "Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and phenotypic characterization of nonmating mutants." *Genetics* 76: 255-71.
- 25 - Mackay, V y TR Manney (1974b). "Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic analysis of nonmating mutants." *Genetics* 76: 273-88.
- Okayasu, I, S Hatakeyama, M Yamada, T Ohkusa, Y Inagaki y R Nakaya (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." *Gastroenterology* 98: 694-702.
- 30 - Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis T. *Molecular cloning-a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1990).
- Santelmann, H. y Howard, J.M. (2005). Yeast metabolic products, yeast antigens and yeasts as possible triggers for irritable bowel syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 17,21-26.
- Schiestl, RH y RD Gietz (1989). "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier." *Curr Genet* 16: 339-46.
- 35 - Schotte, L., Steidler, L., Vanderkerckhove, J. y Remaut, E. (2000). Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 761-765.
- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. y Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 289, 1352-1355
- 40 - Vandenbroucke, K., Hans, W., Van Huysse, J., Neiryck, S., Demetter, P., Remaut, E., Rottiers, P., y Steidler, L. (2004). Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* 127, 502-513.
- Vieira, P, R de Waal-Malefyt, MN Dang, KE Johnson, R Kastelein, DF Fiorentino, JE deVries, MG Roncarolo, TR Mosmann y KW Moore (1991). "Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1172-6.
- 45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VIB vzw

Universiteit Gent

5 <120> USO DE UNA CEPA DE LEVADURA RECOMBINANTE QUE PRODUCE UN COMPUESTO ANTIINFLAMATORIO PARA TRATAR COLITIS

<130> PRO/ydl/V219

10 <150> EP05109153.6

<151> 2005-10-03

<160> 15

15 <170> Patent In versión 3.3

<210> 1

<211>21

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Oligo ml L 10 S

25 <400> 1

cagt acagcc gggaagacaa t

21

<210>2

<211> 25

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligo ml L10 AS

35

<400> 2

gcact agt a gcttttcatttt gat

25

<210>3

<211> 38

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Oligo Spel - TPI - S

<400> 3

10 gcact agt at ccgagattat atct aggaac ccat cagg 38

<210>4

<211>31

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Oligo ppMF-medio- AS

20 <400> 4

ct t ct aaat ctgagtaaccg atgacagctt c 31

<210>5

<211> 28

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligo ppMF-inicio-S

30

<400> 5

atgagatttc ctcaatttt tactgcag 28

<210>6

35 <211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 399 987 T3

<220>

<223> Oligo ml L10- EcoRI - medio- AS

5 <400> 6

caggaat t caaatgctccttgattctgg 30

<210>7

<211> 157

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gln Tyr Ser Arg Glu Asp Asn Asn Cys Thr His Phe Pro Val Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser His Met Leu Leu Glu Leu Arg Thr Ala Phe Ser Gln Val Lys Thr
 20 25 30
 Phe Phe Gln Thr Lys Asp Gln Leu Asp Asn Ile Leu Leu Thr Asp Ser
 35 40 45
 Leu Met Gln Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu
 50 55 60
 Met Ile Gln Phe Tyr Leu Val Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Lys His
 65 70 75 80
 Gly Pro Glu Ile Lys Glu His Leu Asn Ser Leu Gly Glu Lys Leu Lys
 85 90 95
 Thr Leu Arg Met Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu
 100 105 110
 Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Ser Asp Phe Asn Lys Leu
 115 120 125
 Gln Asp Gln Gly Val Tyr Lys Ala Met Asn Glu Phe Asp Ile Phe Ile
 130 135 140
 Asn Cys Ile Glu Ala Tyr Met Met Ile Lys Met Lys Ser
 145 150 155

15

<210>8

<211> 72

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 399 987 T3

<220>

<223> Oligo 5' URA3P-TPI-S

5 <400> 8

ttttgacat caaagaaggt t aatgtggct gtggtttcag ggtccataga ttcccttcaa 60

tttttactgc ag 72

<210>9

<211> 77

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ml L10-3' URA3-AS

15

<400> 9

ctaat ttgtg agtttagt at acatgcat tt acttataat a cagtttttta gcttttcatt 60

ttgatcatca t g t at gc 77

<210> 10

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> URA3-S

<400> 10

tgctgctact catcctagtc 20

30 <210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 399 987 T3

<220>

<223> URA3-AS

<400> 11

5 tcatctcttc cacccat gt c 20

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> 5' URA3 flanqueante-S

15 <400> 12

attgagggcg gat t act acc 20

<210> 13

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ml L10AS

25

<400> 13

aggagt cggg t agcagt at g 20

<210> 14

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> ml L10-S

<400> 14

ES 2 399 987 T3

gcagtgagc aggtgaagag 20

<210> 15

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> 3' URA3 flanqueante-AS

10

<400> 15

cggtgtcc gttgactg 20

REIVINDICACIONES

- 5
1. Uso de una cepa de levadura recombinante que produce un compuesto antiinflamatorio y/o una cepa de levadura que produce un antagonista de citocinas para la preparación de un medicamento para tratar la inflamación de la mucosa, en el que dicho compuesto antiinflamatorio o antagonista de citocinas se muta para evitar o limitar la glucosilación.
 2. El uso de una levadura recombinante según la reivindicación 1, en el que dicha inflamación de la mucosa es una enfermedad intestinal inflamatoria.
 - 10 3. El uso de una cepa de levadura recombinante según la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto antiinflamatorio o antagonista de citocinas se selecciona de la lista que consiste en IL-10, un factor trébol tal como TFF1, TFF2 o TFF3, un antagonista de TNF tal como el receptor de TNF soluble, INCA, ABIN, un antagonista de IL-12, un antagonista de interferón- γ , un antagonista de IL-1 y un análogo de citocina codificado por virus tal como EBV BCRF1.
 4. El uso de una levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho compuesto antiinflamatorio es IL-10 no glucosilada.
 - 15 5. El uso de una cepa de levadura recombinante de según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cepa de levadura se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces* sp., *Hansenula* sp., *Kluyveromyces* sp. *Schizzosaccharomyces* sp. *Zygosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Monascus* sp., *Geotrichum* sp y *Yarrowia* sp.
 - 20 6. Uso de una cepa de levadura recombinante según la reivindicación 5, en el que la *Saccaromyces* sp es *Saccharomyces cerevisiae*.
 7. Uso de una cepa de levadura recombinante según la reivindicación 6, en el que la cepa de levadura recombinante es la subespecie de *Saccharomyces cerevisiae boulardii*.
 8. Uso de una cepa de levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad intestinal inflamatoria es una colitis crónica, enfermedad de Crohn o una colitis ulcerosa.

25

Fig. 3:

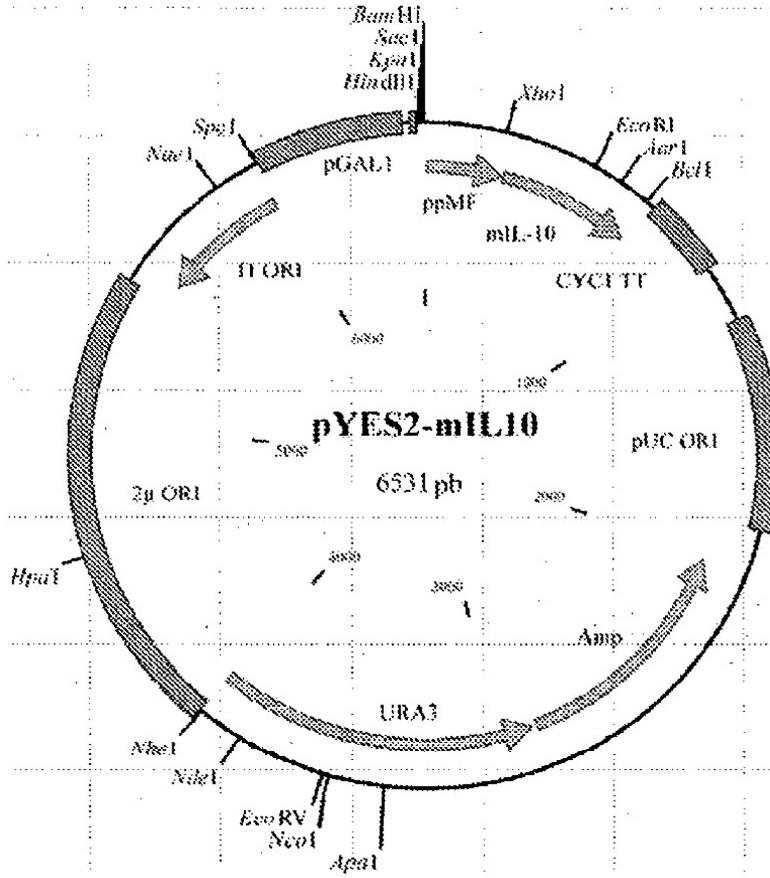


Fig. 4:

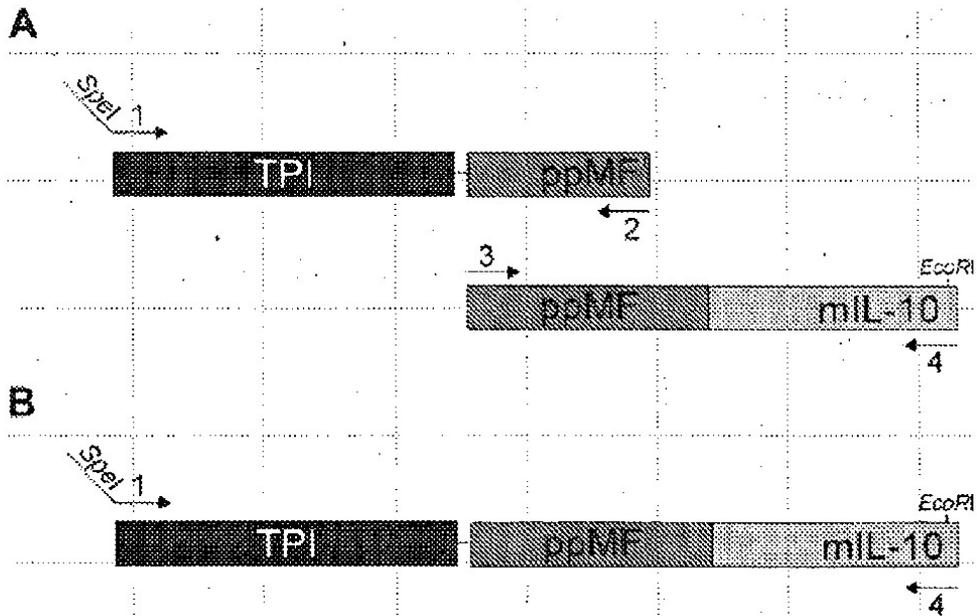


Fig. 5:

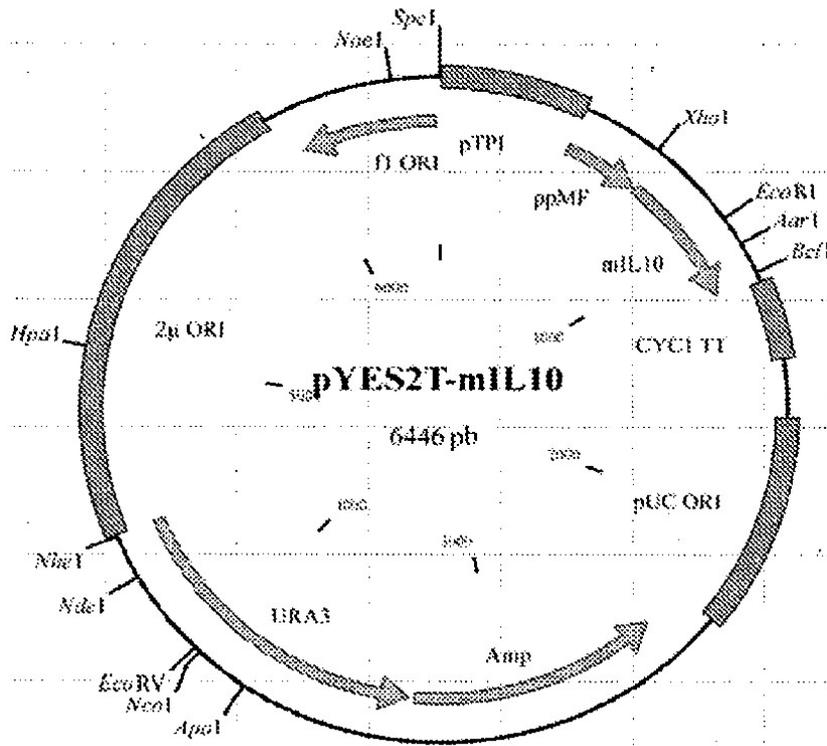


Fig. 6:

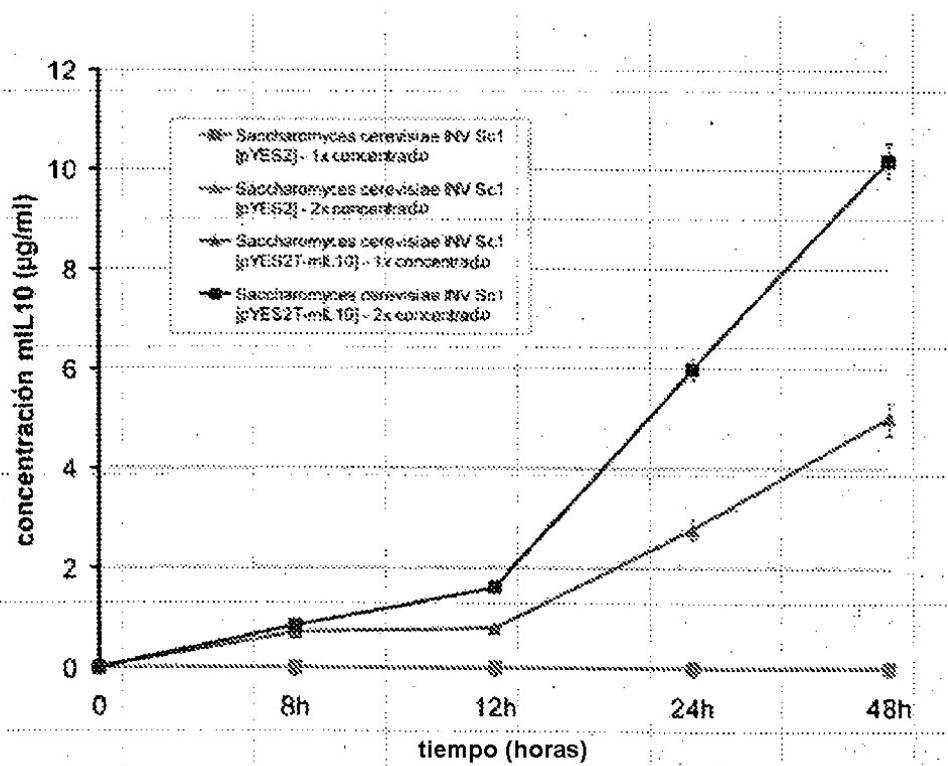


Fig. 7:

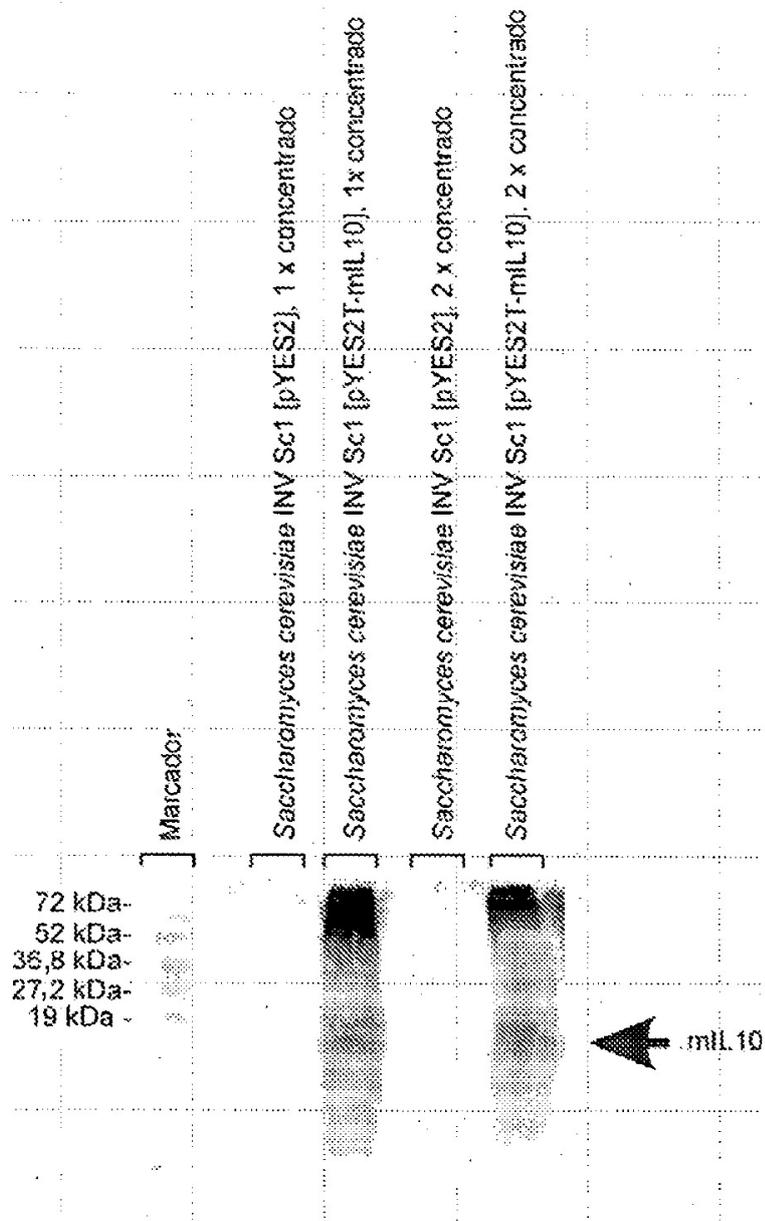


Fig. 8:

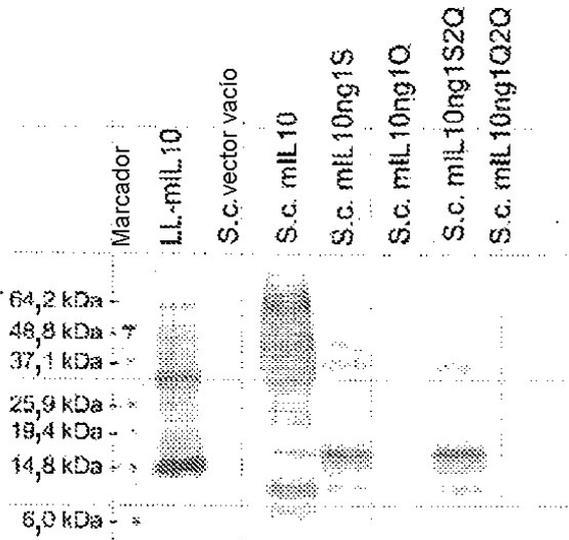


Fig. 9:

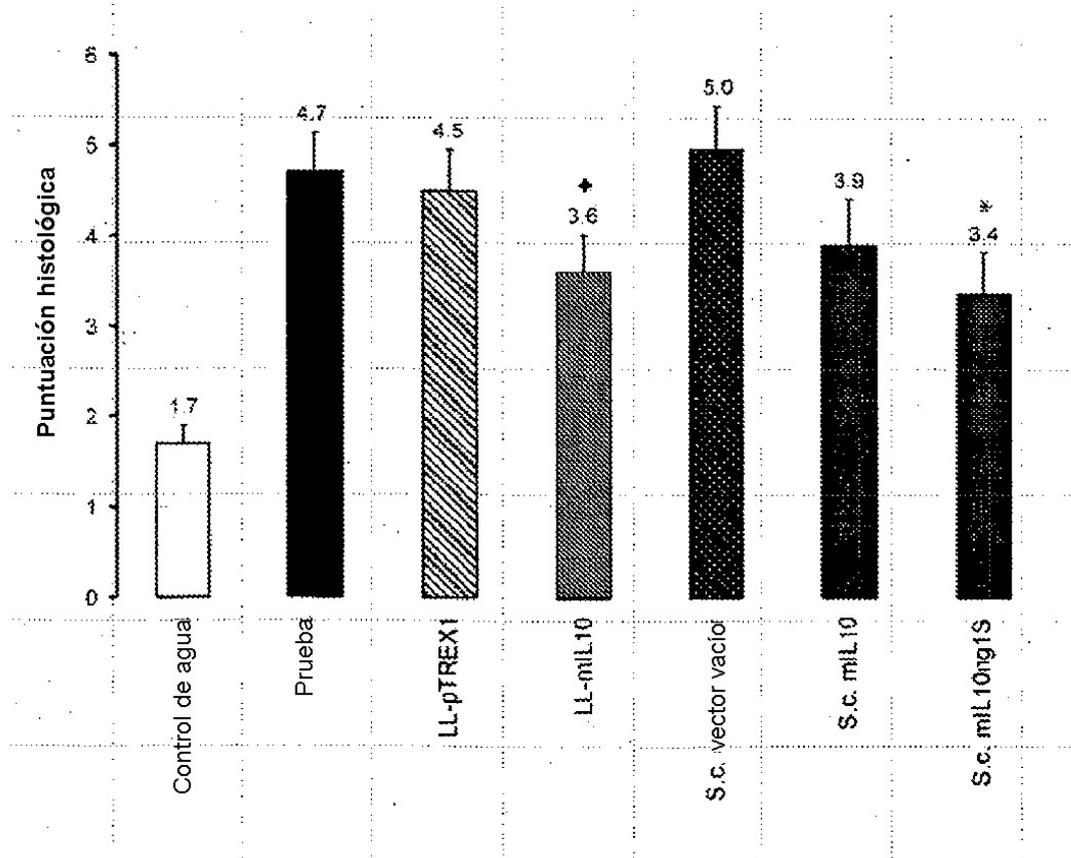


Fig. 10:

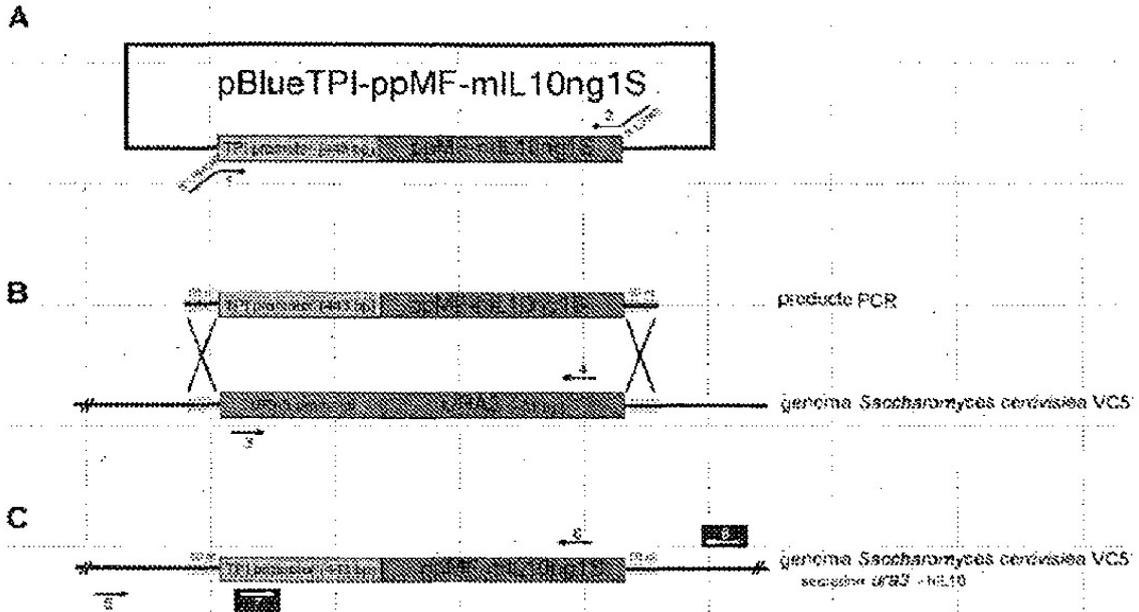


Fig. 11:

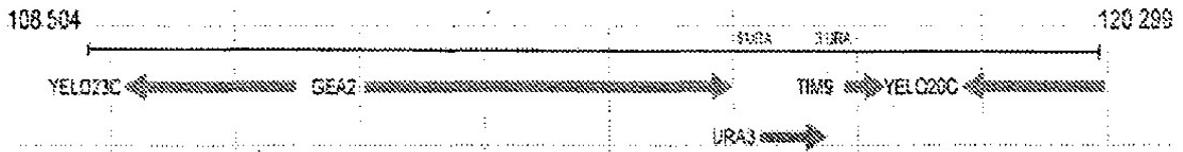


Fig. 12:

