

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 552**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2006 E 09169276 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2119450**

54 Título: **Inducción de tolerancia mucosa a antiantígenos de células beta de islotes pancreáticos**

30 Prioridad:

29.11.2005 EP 05111467

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

31.05.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ROTTIERS, PIETER y
SNOECK, VEERLE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 405 552 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

Inducción de tolerancia mucosa a autoantígenos de células beta de islotes pancreáticos

La presente invención se refiere a la inducción de tolerancia a antígenos, mediante administración mucosa, preferiblemente oral del antígeno en combinación con un microorganismo que produce compuestos inmunomoduladores. Más específicamente, la invención se refiere a la inducción de células T reguladoras específicas de antígeno que producen Foxp3⁺ y/o IL-10 y/o TGF-β, que pueden suprimir respuestas inmunitarias no deseadas hacia un antígeno, mediante administración oral de dicho antígeno en combinación con un microorganismo que secreta citocinas inmunosupresoras.

Campo de la invención

El sistema inmunitario tiene la tarea de distinguir entre lo propio y lo no propio. El sistema inmunitario mucoso, presente a lo largo de las vías respiratorias, el tubo digestivo y las vías genitourinarias, tiene la carga adicional de coexistir con una abundancia de bacterias y antígenos inocuos, tales como alimentos, antígenos transportados por el aire y flora bacteriana comensal. Una característica clave del sistema inmunitario mucoso es su capacidad para seguir siendo tolerante a estos antígenos conservando al mismo tiempo la capacidad para repeler patógenos eficazmente. La introducción de antígeno de manera sistémica, ya sea mediante inyección o lesión, conduce a infiltración local de células inflamatorias y producción de inmunoglobulinas específicas. En cambio, los antígenos introducidos en las superficies mucosas, tales como el tubo digestivo y las vías genitourinarias, provocan la inhibición activa de esta respuesta inmunitaria frente a esos antígenos de manera sistémica. La inducción específica de estas respuestas reguladas mediante la administración de antígeno a través del tubo digestivo se conoce como tolerancia oral. La administración oral de antígeno puede conducir a falta de receptividad sistémica y es una alternativa atractiva a intervenciones médicas inmunosupresoras que tienen efectos secundarios no deseados (tales como esteroides). La invención se basa en particular en el campo de la tolerancia a baja dosis, obtenida mediante exposición repetida a bajas dosis de antígeno. Se han propuesto las inducciones de tolerancia a través de la mucosa como una estrategia de tratamiento frente a enfermedades autoinmunitarias, alérgicas e inflamatorias.

Estado de la técnica

Aunque la tolerancia oral se describió por primera vez en 1911, no fue hasta los últimos años de la década de 1970 cuando los investigadores comenzaron a abordar los mecanismos implicados (Mayer y Shao, 2004a). Se han propuesto varios mecanismos para el desarrollo de tolerancia oral, oscilando desde la delección de anticuerpos anti-células T específicos, pasando por la desviación inmunitaria e inducción de anergia hasta la supresión mediante Tregs (Mucida *et al.*, 2005). La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que hay dos modos distintos de obtener tolerancia oral, la tolerancia a alta dosis, obtenida tras una dosis única alta de antígeno, que se basa en anergia y/o delección (Friedman y Weiner, 1994), y la tolerancia a baja dosis, obtenida mediante exposición repetida a bajas dosis de antígeno, mediada por supresión activa de respuestas inmunitarias mediante células T CD4⁺, incluyendo células T reguladoras que producen Foxp3⁺, IL-10 y/o TGF-β. De manera importante, se ha mostrado que las células T reguladoras inducidas a través de tolerancia mucosa median en la supresión circunstancial, un proceso a través del cual células reguladoras específicas para una proteína suprimen la respuesta de células efectoras cercanas a otra proteína. La supresión circunstancial es una característica importante de la supresión inducida por antígeno porque el conjunto de antígenos que inducen autoinmunidad específica de órgano se desconocen en gran medida, y anula el fenómeno de diseminación de epítomos. La diseminación de epítomos es una complicación de enfermedades alérgicas y autoinmunitarias mediante la cual la respuesta inmunitaria iniciadora se expande con el tiempo induciendo respuestas frente a otros antígenos.

Se ha aludido al papel de las células dendríticas en la inducción de tolerancia oral a través de estudios que muestran tolerancia oral potenciada tras la expansión dirigida por Flt3L de DC (Viney *et al.* 1998) y la activación de DC mediada por RANK-L (Williamson *et al.*, 2002) *in vivo*. En particular, las células dendríticas inmaduras pueden mediar la tolerancia, presumiblemente mediante la inducción de células T reguladoras. Además, la IL-10 puede modular la función de células dendríticas inmaduras e inhibir su diferenciación terminal, amplificando la presencia local de células dendríticas tolerantes implicadas en la inducción de células T reguladoras (De Smedt *et al.* 1997).

Se ha evaluado la inducción de tolerancia mucosa en numerosos modelos experimentales de alergia y enfermedad autoinmunitaria, pero los datos clínicos de ensayos en seres humanos han sido en general decepcionantes. Se han hecho varios intentos de administrar antígenos, ya sea o no en combinación con un compuesto inmunomodulador, con el fin de lograr una tolerancia oral, pero el efecto en la mayoría de los casos no es significativo. En cualquier caso, los resultados no son suficientes para que los métodos se trasladen a seres humanos. El principal problema en todos estos experimentos es que no se observa supresión activa a través de la inducción de células T CD4⁺ y la posterior producción de células T reguladoras específicas de antígeno. Sólo si se observa esto puede obtenerse una supresión activa y verdadera de la respuesta inmunitaria frente a antígenos en seres humanos.

La administración dirigida y más eficaz de moléculas para aplicaciones terapéuticas y profilácticas es una prioridad para la industria farmacéutica. Las estrategias eficaces deben reducir la dosis requerida, aumentar la seguridad y mejorar la eficacia concentrando las moléculas en el sitio de acción deseado. Las vías mucosas de administración

de fármacos y vacunas ofrecen varias ventajas logísticas y biológicas en comparación con la inyección. La administración oral es particularmente atractiva como resultado de la facilidad de administración. Sin embargo, la degradación gastrointestinal y los bajos niveles de absorción hacen generalmente que esta vía de administración de fármacos proteicos y peptídicos sea ineficaz. Están investigándose también vías mucosas alternativas tales como las vías nasal, rectal, pulmonar y ocular.

La administración mucosa de antígenos de vacunas peptídicas y proteicas estimula generalmente respuestas inmunitarias escasas y puede inducir tolerancia inmunológica.

Steidler *et al.* (1998) describen el uso de cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* que expresan conjuntamente IL-2 o IL-6 murina y un antígeno como vehículo de administración de vacunas para potenciar respuestas inmunitarias frente al antígeno. De manera similar, Bermudez-Humaran *et al.* (2003) describen el uso de cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* que expresan IL-12 murina para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno en vacunas.

Battaglia *et al.* (2004) dan a conocer que células T reguladoras de tipo 1 que producen IL-10 desempeñan un papel central en la inducción de tolerancia oral así como sistémica.

Se ha planteado la hipótesis de que la administración mucosa de IL-4, TGF- β , IL-10 (Slavin *et al.*, 2001) y anti-IL-12 potencia la tolerancia. La interleucina-10 (IL-10) desempeña un papel crítico en el desarrollo de tolerancia a baja dosis (Slavin *et al.*, 2001; Mauer *et al.*, 2003). Se ha mostrado que el tratamiento de ratones con proteína básica de la mielina oral a baja dosis e IL-10 oral simultánea reduce la gravedad e incidencia de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, aunque el efecto terapéutico es bajo y está lejos de ser suficiente para que sea eficaz en seres humanos. En estos experimentos, la cantidad de alimentación de IL-10 es alta (de 1 μ g a 10 μ g), aunque las cifras sugieren que administrar dosis superiores es más eficaz. Aunque se observó un efecto supresor de 0,1 μ g de IL-10 *in vitro* sobre la proliferación, la secreción de IFN- γ e IL-12, no se observó efecto del tratamiento con 0,1 μ g de IL-10 más MBP sobre la enfermedad. Se han realizado los mismos experimentos con ratones con administración oral de IL-10 combinada con glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG) oral a baja dosis, que dieron como resultado recidivas reducidas en un modelo de ratón inducido por MOG. También en este caso el efecto terapéutico es bajo y la cantidad de alimentación de IL-10 alta, mostrando las cifras que el uso de dosis superiores es más eficaz. En ambos experimentos, no hay supresión activa, o al menos es insuficiente, de una respuesta inmunitaria mediante una tolerancia inmunitaria de larga duración como para que sea eficaz en seres humanos. En particular, porque para afirmar un efecto terapéutico real, suficiente como para trasladarse a seres humanos, debe observarse una inducción de células T CD4⁺ específicas de antígeno, dando como resultado finalmente una producción de células T reguladoras. Sólo tal mecanismo podría suprimir de manera activa la respuesta inmunitaria en seres humanos. En todos los ejemplos mencionados anteriormente, no se ha observado inducción de células T CD4⁺.

Generalmente se está de acuerdo en que la microflora desempeña un papel en la inducción de tolerancia oral (Moreau y Corthier, 1988; Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2003). Di Giacinto *et al.* (2005) sugieren que probióticos pueden inducir IL-10 y células reguladoras que llevan TGF- β dependientes de IL-10. Sin embargo, está lejos de aclararse cómo se ejerce este efecto, y la simple presencia de microorganismos en el intestino no es suficiente (Rask *et al.*, 2005). Además, aunque los probióticos pueden mejorar los síntomas de alergia y asma, los resultados no son siempre inequívocos y el uso de probióticos solos no es suficiente para inducir una respuesta de tolerancia oral fiable. Se han hecho varios intentos de administrar antígenos a baja dosis mediante bacterias del ácido láctico para prevenir una respuesta inmunitaria alérgica (Daniel *et al.*, 2006) y que condujeron a respuestas de IgA secretoras específicas de alérgeno potenciadas y de IgE específicas de alérgeno reducidas. Aunque se logra en el ratón un desplazamiento deseado en el equilibrio inmunitario desde una respuesta de tipo 2 auxiliar T hacia una respuesta más de tipo auxiliar 1 T, no hay mejoras significativas con respecto a la administración de alérgenos libres. En general, un enfoque de este tipo de una única administración de alérgenos no será suficiente para lograr el mismo resultado en seres humanos. Esto se debe al hecho de que tales estrategias requerirán un periodo muy largo de tratamientos intermitentes, mientras que no se logre una inducción de células T reguladoras, o al menos no suficiente como para instalar un compartimento regulador para lograr un efecto de tolerancia inmunitaria verdadero, activo y de larga duración. En otro ejemplo, la administración oral de lactobacilos recombinantes que expresan antígenos de mielina dio como resultado una reducción en la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental en un modelo de ratón (Maassen *et al.*, 2003). Sin embargo, se considera que el efecto terapéutico es bajo y no suficiente como para trasladarse a seres humanos. En particular, porque para asegurar un efecto terapéutico real, suficiente como para trasladarse a seres humanos, debe observarse una inducción de células T CD4⁺ específicas de antígeno, dando como resultado finalmente una producción de células T reguladoras. Sólo tal mecanismo podría suprimir de manera activa la respuesta inmunitaria en seres humanos. En todos los ejemplos mencionados anteriormente, no se ha examinado la inducción de células T CD4⁺.

Por tanto, sigue habiendo un problema en la técnica para inducir eficazmente tolerancia de antígenos.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, se encontró que la administración mucosa de un antígeno, en combinación con la administración mucosa de un microorganismo que produce un compuesto inmunomodulador, puede inducir una

- 5 respuesta de tolerancia mucosa estable, preferiblemente si tal antígeno se expresa por un microorganismo y preferiblemente si tal administración mucosa se realiza por vía oral. Se observó que la administración mucosa de tal combinación proporciona una supresión significativamente mejor de la respuesta inmunitaria específica de antígeno en comparación con la administración mucosa única de un microorganismo que expresa el antígeno. Incluso más sorprendentemente, la supresión inmunitaria obtenida a través de la invención es significativamente más eficaz en comparación con la administración oral de compuestos inmunomoduladores libres en combinación o no con la administración oral de antígenos.
- 10 Se demuestra que la invención puede inducir tolerancia oral con eficacia mucho más alta que con monoterapia con *L. lactis* que produce IL-10 o antígeno solo, o que antígeno combinado con IL-10 administrada por vía oral libre. Se potenció fuertemente la activación *in vivo* de células T reguladoras específicas de antígeno. Estas células transfieren tolerancia dominante a receptores inmunocompetentes y median incluso en la supresión circunstancial. Se demostró la eficacia de la invención en modelos de ratón de enfermedad alérgica y autoinmunitaria, así como en el contexto de inactivación inmunitaria de productos terapéuticos.
- 15 La presente invención proporciona la materia expuesta en uno cualquiera y todos de los puntos (i) a (xxv) a continuación:
- (i) Un microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β para su uso en el tratamiento de diabetes tipo I en un mamífero.
- (ii) Un microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β para su uso tal como se expone en el punto (i) anterior, como alimento médico o nutracéutico.
- 20 (iii) Un microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β para su uso tal como se expone en el punto (i) o (ii) anterior, que comprende además un anticuerpo anti-CD3.
- (iv) Un microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (i) a (iii) anteriores, en el que dicho antígeno es insulina.
- 25 (v) Un microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (i) a (iv) anteriores, en el que dicho antígeno se administra mediante un microorganismo secretor de antígeno.
- (vi) Un microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (i) a (v) anteriores, siendo dicho microorganismo *Lactococcus lactis*.
- 30 (vii) Un microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (i) a (vi) anteriores, en el que dicho anticuerpo anti-CD3, dicho microorganismo secretor de IL-10, dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de antígeno se administra durante al menos 1 día, preferiblemente durante al menos 1 semana, más preferiblemente durante al menos 1 mes o 1 año.
- 35 (viii) Un microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (ii) a (vii) anteriores, en el que dicho medicamento, alimento médico o nutracéutico es para administración mucosa.
- (ix) Un microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (i) a (viii) anteriores, en el que dicho mamífero se elige del grupo que consiste en ratón, rata, perro, gato, ganado, caballo, cerdo y ser humano.
- 40 (x) Una composición que comprende un microorganismo secretor de IL-10 y un autoantígeno de células β .
- (xi) La composición tal como se expone en el punto (x) anterior, que comprende además un anticuerpo anti-CD3.
- (xii) La composición tal como se expone en el punto (x) o (xi) anterior, en la que dicho antígeno es insulina.
- (xiii) La composición tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (x) a (xii) anteriores, en la que dicho antígeno se administra mediante un microorganismo secretor de antígeno.
- 45 (xiv) La composición tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (x) a (xiii) anteriores, en la que dicho microorganismo es *Lactococcus lactis*.
- (xv) La composición tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (x) a (xiv) anteriores, en la que dicho anticuerpo anti-CD3, dicho antígeno, dicho microorganismo que expresa un antígeno y/o dicho microorganismo que expresa un compuesto inmunomodulador están presentes en un pulverizador, una cápsula, un aerosol, pastillas para chupar, un bolo, un comprimido, sobres, un líquido, una suspensión, una emulsión o trociscos.
- 50 (xvi) La composición tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (x) a (xv) anteriores, siendo dicha

composición una composición farmacéutica.

(xvii) La composición tal como se expone en el punto (x) anterior para su uso en el tratamiento de diabetes tipo I en un mamífero.

5 (xviii) La composición para su uso tal como se expone en el punto (xvii) anterior, para su uso como alimento médico o nutracéutico.

(xix) La composición para su uso tal como se expone en los puntos (xvii) o (xviii) anteriores, que comprende además un anticuerpo anti-CD3.

(xx) La composición para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (xvii) a (xix) anteriores, en la que dicho antígeno es insulina.

10 (xxi) La composición para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (xvii) a (xx) anteriores, en la que dicho antígeno se administra mediante un microorganismo secretor de antígeno.

(xxii) La composición para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (xvii) a (xxi) anteriores, en la que dicho microorganismo es *Lactococcus lactis*.

15 (xxiii) La composición para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (xvii) a (xxii) anteriores, en la que dicho anticuerpo anti-CD3, dicho microorganismo secretor de IL-10, dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de antígeno se administra durante al menos 1 día, preferiblemente durante al menos 1 semana, más preferiblemente durante al menos 1 mes o 1 año.

(xxiv) La composición para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (xviii) a (xxiii) anteriores, en la que dicho alimento médico o nutracéutico es para administración mucosa.

20 (xxv) La composición para su uso tal como se expone en uno cualquiera de los puntos (xvii) a (xxiv) anteriores, en la que dicho mamífero se elige del grupo que consiste en ratón, rata, perro, gato, ganado, caballo, cerdo y ser humano.

Descripción detallada de la invención

25 A lo largo de toda esta descripción, se hace referencia a diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas mediante una mención de identificación. Las descripciones de estas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas describen más completamente el estado de la técnica a la que esta invención pertenece.

A. Técnicas generales

30 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química orgánica, farmacología, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); la serie "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, y publicaciones periódicas) "Polymerase Chain Reaction" (Mullis *et al.*, eds., 1994); y "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991).

B. Definiciones

40 Tal como se usan en el presente documento, determinados términos pueden tener los siguientes significados definidos. Tal como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas. De manera similar, el uso de "un compuesto" para tratamiento o preparación de medicamento tal como se describe en el presente documento contempla el uso de uno o más compuestos de esta invención para tal tratamiento o preparación a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos mencionados, pero sin excluir otros. "Que consiste esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará que se excluyen otros elementos de significación esencial para la combinación. Por tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en el presente documento no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Que consiste en" significará que se excluyen más que elementos traza de otros componentes y etapas de método sustanciales para administrar las composiciones de esta invención.

Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Se describe en el presente documento un método para inducir tolerancia inmunitaria frente a un antígeno, que comprende la administración mucosa de dicho antígeno, en combinación con la administración mucosa de un microorganismo que produce un compuesto inmunomodulador.

- 5 También se describe en el presente documento el uso de un microorganismo que produce un compuesto inmunomodulador en combinación con un antígeno para la preparación de un medicamento para administración mucosa para inducir tolerancia inmunitaria.

10 Preferiblemente, dicha tolerancia inmunitaria se induce en un animal. Dicho animal es un mamífero, y se elige preferiblemente del grupo que consiste en ratón, rata, cerdo, vaca, oveja, caballos y ser humano. Preferiblemente, dicho mamífero es un ser humano.

Preferiblemente, dicha tolerancia inmunitaria es tolerancia mucosa.

15 Mucosa tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier mucosa tal como mucosa oral, mucosa rectal, mucosa uretral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa bucal, mucosa pulmonar y mucosa nasal. Administración mucosa tal como se usa a lo largo de toda la solicitud abarca la administración a la mucosa. La administración a la mucosa oral incluye vías de administración bucal, sublingual y gingival. Por consiguiente, la presente invención se refiere al método en el que dicha administración bucal se elige del grupo que consiste en administración rectal, administración bucal, administración pulmonar, administración ocular, administración nasal, administración vaginal y administración oral. Preferiblemente, dicha administración mucosa es administración oral y dicha tolerancia es tolerancia oral.

20 Tolerancia mucosa tal como se usa a lo largo de toda la solicitud es la inhibición de la receptividad inmunitaria específica a un antígeno en un animal (incluyendo seres humanos), después de que dicho animal se haya expuesto a dicho antígeno mediante la vía mucosa. Preferiblemente, dicha tolerancia mucosa es tolerancia sistémica. La exposición posterior del antígeno puede ser toda exposición conocida por el experto en la técnica, tal como exposición mediante inyección parenteral, mediante administración mucosa o mediante producción endógena tal como en el caso de autoantígenos. La tolerancia oral es la inhibición de la receptividad inmunitaria específica a un antígeno en un animal (incluyendo seres humanos), después de que dicho animal se haya expuesto a dicho antígeno mediante la vía oral. La tolerancia oral a baja dosis es la tolerancia oral inducida por bajas dosis de antígenos, y se caracteriza por supresión inmunitaria activa, mediada por células T reguladoras sensibles a ciclofosfamida que pueden transferir tolerancia a huéspedes sin tratamiento previo. La tolerancia oral a alta dosis es la tolerancia oral inducida por altas dosis de antígenos, es insensible a tratamiento con ciclofosfamida y avanza hasta la inducción de hiperreceptividad de células T mediante anergia y/o delección de células T específicas de antígeno. La diferencia en la sensibilidad a ciclofosfamida puede usarse para realizar una distinción entre tolerancia a baja dosis y a alta dosis (Strobel *et al.*, 1983). Preferiblemente, dicha tolerancia oral es tolerancia oral a baja dosis tal como se describe por Mayer y Shao (2004b).

35 La presente invención se refiere por tanto a un método o uso tal como se describe en el presente documento, en el que dicha inducción de tolerancia inmunitaria es de al menos 1,5, preferiblemente 2, más preferiblemente 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción. Alternativamente, dicho antígeno se tolera al menos 1,5, 2, 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción. La inducción de tolerancia inmunitaria puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, dicha inducción de tolerancia inmunitaria puede medirse mediante la modulación del nivel de una citocina en dicho animal. Como tal, la modulación puede ser un aumento del nivel de una citocina, por ejemplo dicho aumento del nivel de una citocina es de al menos 1,5, 2, 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción. Alternativamente, dicha modulación es una disminución del nivel de una citocina particular, por ejemplo dicha disminución del nivel de citocina es de al menos 1,5, 2, 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción. La citocina según la invención es IL-10. También se dan a conocer citocinas elegidas del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ , IFN- α , MCP-1, TGF β , RANK-L y Flt3L.

45 El antígeno según la invención es un autoantígeno de células β . También se da a conocer como antígeno cualquier sustancia que provoque una respuesta inmunitaria cuando se introduce en el cuerpo de un animal, en el que dicha respuesta inmunitaria puede ser una respuesta mediada por células T y/o mediada por células B. Las respuestas mediadas por células T cubren respuestas Th1 y/o Th2. También se describe un antígeno, tal como, pero sin limitarse a alérgenos (incluyendo alérgenos alimentarios), aloantígenos, antígenos propios, autoantígenos y moléculas terapéuticas o antígenos que inducen una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, dicho antígeno está implicado en la inducción de diabetes tipo. También se describe un antígeno implicado en la inducción de asma alérgica, esclerosis múltiple, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, artritis reumatoide, alergia alimentaria, enfermedad celíaca o enfermedad de injerto contra huésped.

55 Una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria tal como se usa en el presente documento es una enfermedad provocada por una respuesta inmunitaria no deseada del cuerpo contra un antígeno, mediante lo cual dicho antígeno puede ser o bien un antígeno heterólogo o bien un autoantígeno. Las enfermedades relacionadas con respuesta inmunitaria incluyen, pero no se limitan a reacción alérgica incluyendo alergia alimentaria, enfermedad

celíaca, asma alérgica, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, artritis reumatoide, diabetes tipo I y esclerosis múltiple. Las enfermedades relacionadas con respuesta inmunitaria también incluyen reacciones inmunitarias no deseadas tales como enfermedad de injerto contra huésped o inmunoadministración de medicamento tal como la producción de anticuerpos contra el factor VIII no endógeno. Según la invención, la enfermedad es diabetes tipo I. También se describe una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en asma alérgica, alergia alimentaria, enfermedad celíaca e inactivación inmunitaria de productos terapéuticos. Por tanto, se apreciará que las enfermedades relacionadas con respuesta inmunitaria incluyen, pero no se limitan a reacción alérgica incluyendo alergia alimentaria, enfermedad celíaca, asma alérgica, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, artritis reumatoide, diabetes tipo I y esclerosis múltiple. Las enfermedades relacionadas con respuesta inmunitaria también incluyen reacciones inmunitarias no deseadas tales como enfermedad de injerto contra huésped o inmunoadministración de medicamento tal como la producción de anticuerpos contra el factor VIII no endógeno. Según la invención, la enfermedad es diabetes tipo I. También se describe una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en asma alérgica, alergia alimentaria, enfermedad celíaca, enfermedad de injerto contra huésped e inactivación inmunitaria de productos terapéuticos.

En realizaciones adicionales, dicho antígeno se administra mediante un microorganismo que expresa el antígeno. Preferiblemente, dicho antígeno se administra mediante un microorganismo que presenta el antígeno o que secreta el antígeno. Por tanto, la invención se refiere a un método tal como se describe en el presente documento en el que dicho antígeno se presenta en la superficie de dicho microorganismo que expresa el antígeno o en el que se expresa dicho antígeno. El compuesto inmunomodulador y el antígeno pueden administrarse mediante el mismo microorganismo, o puede ser un microorganismo diferente.

En vista de lo anterior, se apreciará por tanto que la presente invención se refiere a un método o uso tal como se describe en el presente documento, siendo dicho método o uso terapéutico y/o profiláctico.

Compuesto significa cualquier complejo o compuesto químico o biológico, incluyendo moléculas orgánicas e inorgánicas simples o complejas, péptidos, peptidomiméticos, proteínas, complejos proteicos, anticuerpos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos o derivados de los mismos. Un compuesto inmunomodulador es un compuesto que modifica la función del sistema inmunitario. Un compuesto inmunomodulador tal como se usa en el presente documento es un compuesto que induce tolerancia; la inducción de tolerancia puede obtenerse, como ejemplo no limitativo, de un modo directo induciendo células T reguladoras tales como Treg, Tr1 o Th3, o desplazando el equilibrio Th1/Th2 hacia Th1, o de un modo indirecto, mediante activación de células dendríticas inmaduras a células dendríticas tolerantes y/o inhibiendo la respuesta inmunitaria Th2 induciendo la expresión de factores de "coestimulación" sobre células dendríticas maduras. El experto en la técnica conoce compuestos inmunomoduladores e inmunosupresores e incluyen, pero no se limitan a metabolitos bacterianos tales como espergualina, metabolitos fúngicos y de estreptomices tales como tacrolímus o ciclosporina, citocinas inmunosupresoras tales como IL-4, IL-10, IFN α , TGF β (como adyuvante selectivo para células T reguladoras), Flt3L, TSLP y Rank-L (como inductores de DC tolerogénicas selectivas), anticuerpos y/o antagonista tal como anti-CD40L, anti-CD25, anti-CD20, anti-IgE, anti-CD3 y proteínas, péptidos o proteínas de fusión tales como la proteína de fusión CTL-4-Ig o CTLA-4-agonista.

El compuesto inmunomodulador según la invención es IL-10. También se describe un compuesto inmunomodulador que es un compuesto inmunosupresor, tal como un anticuerpo o citocina inmunosupresora. Por ejemplo, dicha citocina inmunosupresora es un anticuerpo o citocina que potencia la tolerancia. El experto en la técnica conoce citocinas inmunosupresoras, e incluyen, pero no se limitan a IL-4, IL-10, IFN- α y TGF β , como adyuvante selectivo para células T reguladoras; y Flt3L, TSLP y Rank-L, como inductores de DC tolerogénicas selectivas. Según la invención, dicha citocina inmunosupresora es IL-10. Se selecciona una citocina inmunosupresora descrita adicionalmente del grupo que consiste en IL-, IFN α y Flt3L. El experto en la técnica apreciará que la presente invención también se refiere a homólogos funcionales de las mismas. Un homólogo funcional connota una molécula que tiene esencialmente la misma o similar función, al menos para los fines pretendidos, pero que puede diferir estructuralmente. Según la invención, dicha citocina que potencia la tolerancia inmunosupresora es IL-10, o un homólogo funcional de la misma. También se describe un anticuerpo inmunosupresor elegido del grupo que consiste en anti-IL-2, anti-IL12, anti-IL6, anti-IFN-Y.

Administración tal como se usa en el presente documento significa cualquier método de administración conocido por el experto en la técnica e incluye, pero sin limitarse a, formulaciones farmacéuticas recubiertas o no recubiertas del compuesto a administrar, cápsulas, liposomas, cuerpos de aceite, partículas de polímero que comprenden o que portan el compuesto a administrar o microorganismos que secretan, que presentan o que acumulan el compuesto a administrar, opcionalmente en presencia de compuestos que pueden potenciar la administración mucosa y/o la captación mucosa.

Pueden administrarse compuestos o composiciones descritas en el presente documento en forma pura, combinadas con otros principios activos, o combinadas con portadores o excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones orales incluirán generalmente un portador diluyente inerte o un portador comestible. Pueden incluirse materiales adyuvantes y/o agentes de unión farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina,

un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente de dispersión tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo o aromatizante de naranja. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un portador líquido tal como un ácido graso. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener otros diversos materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, laca o agentes entéricos. Además, un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y determinados conservantes, tintes, colorantes y aromatizantes. Se apreciará que la forma y el carácter del portador farmacéuticamente aceptable vienen dictados por la cantidad del principio activo con el que se combina, la vía de administración y otras variables bien conocidas. El/los portador(es) debe(n) ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de la misma.

Las preparaciones alternativas para la administración incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son dimetilsulfóxido, alcoholes, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen mezclas de alcoholes y agua, medios tamponados y solución salina. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de nutrientes y fluidos, reabastecedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Son posibles diversas formulaciones líquidas para estos métodos de administración, incluyendo solución salina, alcohol, DMSO y disoluciones a base de agua.

Preferiblemente, dicha citocina inmunosupresora se expresa en bajas cantidades, preferiblemente 0,1 µg o inferior por dosis de bacterias administrada en un entorno experimental de ratones, tales cantidades han de trasladarse a un entorno de enfermedad humana. Se demuestra que la invención puede inducir tolerancia oral con eficacia mucho más alta que con monoterapia con microorganismo que produce IL-10 o antígeno, tal como *L. lactis* solo, o que antígeno combinado con IL-10 administrada por vía oral libre. La activación *in vivo* de células T reguladoras específicas de antígeno se potenció fuertemente. Estas células transfieren tolerancia dominante a receptores inmunocompetentes y median incluso en la supresión circunstancial. La eficacia de la invención se demostró en modelos de ratón de enfermedad alérgica y autoinmunitaria, así como en el contexto de inactivación inmunitaria de productos terapéuticos.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares, tal como se usan en el presente documento incluyen la mejora o eliminación de un estado o enfermedad mental desarrollada una vez que se ha establecido o el alivio de los síntomas característicos de tal enfermedad o estado. Tal como se usa en el presente documento, estos términos también abarcan, dependiendo del estado del paciente, prevenir la aparición de una enfermedad o estado o síntomas asociados con el mismo antes de la aflicción con dicha enfermedad o estado. Tal prevención o reducción antes de la aflicción se refiere a la administración del compuesto o la composición de la invención a un paciente que no está en el momento de la administración aquejado por la enfermedad o estado. "Prevenir" también abarca prevenir la recaída o la prevención de la recidiva de una enfermedad o estado o de síntomas asociados con el mismo, por ejemplo tras un periodo de mejora. Debe quedar claro que los estados mentales pueden ser responsables de molestias físicas. En este sentido, el término "tratar" también incluye la prevención de un estado o enfermedad física o la mejora o eliminación del estado o enfermedad física desarrollada una vez que se ha establecido o el alivio de los síntomas característicos de tales estados.

Tal como se usa en el presente documento, el término "medicamento" también abarca los términos "fármaco", "producto terapéutico", "poción" u otros términos que se usan en el campo de la medicina para indicar una preparación con efecto terapéutico o profiláctico.

Se apreciará que los compuestos de la invención, es decir, el antígeno y la molécula inmunomoduladora se administran o se expresan en una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" pretende referirse a una cantidad de un compuesto o composición de la presente invención que provocará una respuesta o efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra según el régimen de tratamiento deseado. Preferiblemente, los compuestos o la composición se proporcionan en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo un comprimido, una cápsula o una dosis de aerosol medida, de modo que se administra una dosis única al sujeto, por ejemplo un paciente.

En combinación con, tal como se usa a lo largo de toda la solicitud implica, en un determinado momento, la presencia simultánea del antígeno y el compuesto inmunomodulador al nivel de la mucosa. No implica que tanto el antígeno como el compuesto inmunomodulador necesiten estar siempre presentes simultáneamente al nivel de la mucosa. Por tanto, el método cubre tanto la administración simultánea de microorganismos que producen el compuesto inmunomodulador y el antígeno, así como la administración secuencial del microorganismo que produce el compuesto inmunomodulador y el antígeno, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización adicional, dicho antígeno se administra simultáneamente con, o de manera secuencial a dicho microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador.

- 5 Una realización preferida es la administración simultánea del microorganismo que produce el compuesto inmunomodulador y el antígeno. En este caso, el microorganismo que produce el compuesto inmunomodulador y el antígeno pueden estar comprendidos en la misma formulación farmacéutica, o en más de una formulación farmacéutica tomadas juntas. Una realización preferida es la administración mediante un microorganismo que produce tanto el antígeno como el compuesto inmunomodulador.
- Cuando el microorganismo que expresa el compuesto inmunomodulador y el antígeno o la composición que comprende ambos elementos se administran simultáneamente, los compuestos o principios activos pueden estar presentes en una única formulación o composición farmacéutica.
- 10 Alternativamente, los compuestos o principios activos se administran en formulaciones o composiciones farmacéuticas separadas para uso separado o simultáneo. La invención también se refiere por tanto a composiciones farmacéuticas que comprenden el microorganismo que expresa molécula inmunomoduladora y el antígeno de la invención y a los usos de estas composiciones farmacéuticas.
- 15 En el caso de administración secuencial, o bien el antígeno o bien el microorganismo que produce el compuesto inmunomodulador pueden administrarse en primer lugar. En el caso de administración secuencial, el tiempo entre la administración del antígeno y el microorganismo que produce el compuesto inmunomodulador es preferiblemente de no más de 3 horas, incluso más preferiblemente de no más de dos horas, lo más preferiblemente de no más de una hora.
- 20 Los principios activos pueden administrarse de desde 1 hasta 6 veces al día, suficiente para presentar la actividad deseada. Estas dosis diarias pueden administrarse como una dosis única una vez al día, o pueden administrarse como dos o más dosis más pequeñas a los mismos o diferentes tiempos del día que en total proporcionan la dosis diaria especificada. Preferiblemente, el principio activo se administra una vez o dos veces al día. Se contempla que ambos agentes activos se administren al mismo tiempo, o muy próximos en el tiempo. Alternativamente, un compuesto podría tomarse por la mañana y el otro posteriormente en el día. O en otro escenario, un compuesto podría tomarse dos veces al día y el otro una vez al día, o bien al mismo tiempo que se produce una de las dosificaciones dos veces al día, o bien por separado. Preferiblemente, ambos compuestos se tomarían juntos al mismo tiempo y se administran como una mezcla. En una realización, el segundo compuesto se administra simultáneamente con, separado de o de manera secuencial a dicho primer compuesto.
- 25 En todos los aspectos de la invención, la dosis de mantenimiento diaria puede administrarse durante un periodo clínicamente deseable en el paciente, por ejemplo de desde 1 día hasta varios años (por ejemplo durante toda la vida restante del mamífero); por ejemplo desde aproximadamente (2 ó 3 ó 5 días, 1 ó 2 semanas, o 1 mes) hacia arriba y/o por ejemplo hasta aproximadamente (5 años, 1 año, 6 meses, 1 mes, 1 semana, o 3 ó 5 días). Es típica la administración de la dosis de mantenimiento diaria durante de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días o durante de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 1 año. Otros constituyentes de las formulaciones líquidas pueden incluir conservantes, sales inorgánicas, ácidos, bases, tampones, nutrientes, vitaminas u otros productos farmacéuticos.
- 30 El microorganismo que secreta el compuesto inmunomodulador y/o el antígeno puede administrarse en una dosis de al menos 10^4 unidades formadoras de colonias (ufc) a 10^{12} ufc al día, preferiblemente entre 10^9 ufc y 10^{12} ufc al día, lo más preferiblemente entre 10^9 ufc y 10^{12} ufc al día. Según el método descrito en Steidler *et al.* (Science 2000), el compuesto inmunomodulador de por ejemplo de 10^9 ufc se secreta hasta de al menos 1 ng a 100 ng. A través de ELISA, conocido por un experto en la técnica, el antígeno de por ejemplo de 10^9 ufc se secreta hasta de al menos 1 ng hasta 100 ng; el experto en la técnica puede calcular el intervalo de secreción de compuesto inmunomodulador y/o antígeno en relación con cualquier otra dosis de ufc.
- 35 El antígeno puede administrarse en una dosis que induce una respuesta a baja dosis. Preferiblemente, dicho antígeno se administra en una dosis de al menos 10 fg a 100 μ g al día, preferiblemente entre 1 pg y 100 μ g al día, lo más preferiblemente entre 1 ng y 100 μ g al día.
- 40 El compuesto inmunomodulador de la invención puede administrarse en una dosis de al menos 10 fg a 100 μ g al día, preferiblemente entre 1 pg y 100 μ g al día, lo más preferiblemente entre 1 ng y 100 μ g al día.
- 45 Preferiblemente, los compuestos o la composición se proporcionan en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo un comprimido, una disolución, una cápsula o una dosis de aerosol medida, de modo que se administra una dosis única al sujeto, por ejemplo un paciente.
- 50 Dependiendo del modo de administración, por ejemplo oral, o cualquiera de los descritos anteriormente, el experto en la técnica conoce cómo definir o calcular la dosis real que va a administrarse a un paciente. El experto en la técnica tendrá conocimientos sobre cómo ajustar las dosis dependiendo del paciente, el microorganismo, el vector, etcétera.
- 55 Los compuestos de la presente invención también pueden tomar la forma de una sal, hidrato, solvato o metabolito farmacológicamente aceptable. Las sales farmacológicamente aceptables incluyen sales básicas de ácidos orgánicos e inorgánicos, incluyendo pero sin limitarse a ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido

fosfórico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido málico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fenilacético, ácido mandélico y similares. Cuando los compuestos de la invención incluyen una función ácida, tal como un grupo carboxilo, entonces los expertos en la técnica conocen bien pares catiónicos farmacéuticamente aceptables para el grupo carboxilo e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio, de amonio cuaternario y similares.

El microorganismo puede ser cualquier microorganismo, incluyendo bacterias, levaduras u hongos, adecuados para administración mucosa. Preferiblemente, dicho microorganismo es un microorganismo no patógeno, incluso más preferiblemente dicho microorganismo es un microorganismo probiótico. El experto en la técnica conoce organismos probióticos. Los organismos probióticos incluyen, pero no se limitan a, bacterias tales como *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Bifidobacterium sp.* y levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* subespecie *bouardii*. Preferiblemente, dicha bacteria es una bacteria del ácido láctico; incluso más preferiblemente, dicha bacteria el ácido láctico se elige del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Camobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. En una realización adicional preferida, dicho microorganismo es *Lactococcus lactis*. En otra realización preferida, dicho microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae*.

En una realización preferida, la citocina inmunosupresora se combina con anticuerpos antagonizantes contra citocinas inmunoadductoras, tales como anti-IL-2, anti-IL-12 y/o anti-IFN γ ; y moléculas coestimuladoras, tales como anti-CD40L y anti-CD3. Alternativamente, pueden administrarse compuestos que estimulan la producción de las citocinas inmunosupresoras, tales como subunidad B de la toxina del cólera; y moléculas que estimulan la función de células T reguladoras, tales como agonistas de CTLA-4 e ICOS. Tal como se describió anteriormente, preferiblemente, dicho microorganismo es un microorganismo no patógeno, incluso más preferiblemente es un microorganismo probiótico. El experto en la técnica conoce organismos probióticos, e incluyen, pero no se limitan a bacterias tales como *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Bifidobacterium sp.* y levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* subespecie *bouardii*. En una realización preferida, dicho microorganismo es *Lactococcus lactis*. En otra realización preferida, dicho microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae*. Lo más preferiblemente, dicho microorganismo probiótico es una bacteria del ácido láctico, ya que se ha descrito la administración de proteínas heterólogas (es decir, proteínas de bacterias que no son del ácido láctico) por bacterias del ácido láctico en la mucosa, incluyendo administración tanto oral como vaginal (Steidler y Rottiers, 2006; Liu *et al.*, 2006), lo que hace que estas bacterias del ácido láctico sean extremadamente adecuadas para la administración de tanto antígeno como compuesto inmunomodulador.

También se describe el uso de un microorganismo que produce compuesto inmunomodulador, en combinación con un antígeno para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria. Dicho compuesto inmunomodulador puede ser una citocina inmunosupresora. Dicho antígeno puede administrarse mediante un microorganismo secretor de antígeno. El compuesto inmunomodulador y el antígeno pueden administrarse mediante el mismo microorganismo, o puede ser un microorganismo diferente. Dicha citocina inmunosupresora puede ser una citocina inmunosupresora, que potencia la tolerancia. El experto en la técnica conoce citocinas inmunosupresoras, que potencian la tolerancia, e incluyen, pero no se limitan a IL-4, IL-10, IFN α y TGF β , Flt3L y Rank-L. Según la invención, dicha citocina inmunomoduladora es IL-10. También se describe una citocina inmunosupresora seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IFN α y Flt3L. Tal como se da a conocer en el presente documento, dicha citocina inmunosupresora es IL-10, o un homólogo funcional de la misma. En una realización preferida, la citocina inmunosupresora se combina con anticuerpos antagonizantes contra citocinas inmunoadductoras, tales como anti-IL-2, anti-IL-12 y/o anti-IFN γ y moléculas coestimuladoras, tales como anti-CD40L y anti-CD3. Preferiblemente, dicha citocina inmunosupresora se expresa en bajas cantidades, preferiblemente de 0,1 μ g o inferiores en un entorno experimental de ratones, tales cantidades han de trasladarse a un entorno de enfermedad humana.

Se apreciará que los compuestos y las composiciones de la invención pueden usarse como nutracéuticos, alimentos médicos o funcionales o como aditivos en dichos nutracéuticos, alimentos médicos o funcionales. Otra realización proporciona un alimento o bebida, preferiblemente adaptado para consumo humano, que está compuesto por un nutracéutico y un agente aromatizante, en el que el nutracéutico está compuesto por un extracto de un producto agrícola.

Los nutracéuticos, ya estén en forma de un extracto líquido o una composición seca, son comestibles y pueden ingerirse directamente por seres humanos, pero preferiblemente se proporcionan a seres humanos en forma de aditivos o complementos nutricionales por ejemplo en forma de comprimidos de la clase comercializada en tiendas de alimentos naturales, o como ingredientes en productos alimenticios sólidos comestibles, más preferiblemente procesados tales como cereales, panes, tofu, galletas, helado, pasteles, patatas fritas, pretzels, queso, etc., y en líquidos bebibles, por ejemplo, bebidas tales como leche, soda, bebidas deportivas y zumos de frutas. Por tanto, en una realización, se proporciona un método para potenciar el valor nutricional de un alimento o bebida entremezclando el alimento o bebida con un nutracéutico en una cantidad que es eficaz para potenciar el valor nutricional del alimento o bebida.

Otra realización proporciona un método para potenciar el valor nutricional de un alimento o bebida que comprende

entremezclar un alimento o bebida con un nutraceutico para producir un alimento o bebida nutricionalmente potenciado, en el que el nutraceutico se entremezcla en una cantidad eficaz para potenciar el valor nutricional del alimento o bebida, en el que el nutraceutico está compuesto por un extracto de un cultivo que comprende los antígenos de la presente invención, y en el que el alimento o bebida nutricionalmente potenciado puede comprender además un agente aromatizante. Los agentes aromatizantes preferidos incluyen edulcorantes tales como azúcar, jarabe de maíz, fructosa, dextrosa, maltodextrina, ciclamatos, sacarina, fenilalanina, xilitol, sorbitol, maltitol y edulcorantes de hierbas, por ejemplo, *Stevia*.

Los nutraceuticos descritos en el presente documento están destinados a consumo humano y por tanto los procedimientos para obtenerlos se realizan preferiblemente según las buenas prácticas de fabricación (BPF) y cualquier regulación gubernamental aplicable que rija tales procedimientos. Procedimientos especialmente preferidos utilizan sólo disolventes derivados de manera natural. Los nutraceuticos descritos en el presente documento contienen preferiblemente niveles relativamente altos de sustancias que potencian la salud. Los nutraceuticos pueden entremezclarse entre sí para aumentar sus efectos potenciadores de la salud.

En contraposición a los nutraceuticos, los denominados "alimentos medicos" no están destinados a usarse por el público general y no están disponibles en tiendas o supermercados. Los alimentos medicos no son los alimentos incluidos dentro de una dieta sana para disminuir el riesgo de enfermedad, tales como alimentos reducidos en grasa o alimentos bajos en sodio, ni son productos para la pérdida de peso. Un médico prescribe un alimento médico cuando un paciente tiene necesidades de nutrientes especiales con el fin de gestionar una enfermedad o estado de salud, y el paciente está bajo la atención continua del médico. La etiqueta debe establecer claramente que el producto está destinado a usarse para gestionar un estado o trastorno médico específico. Un ejemplo de un alimento médico es un alimento médico nutricionalmente diverso diseñado para proporcionar soporte nutricional dirigido para pacientes con estados inflamatorios crónicos. Los compuestos activos de este producto son por ejemplo uno o más de los compuestos descritos en el presente documento. Los alimentos funcionales abarcan los alimentos incluidos dentro de una dieta sana para disminuir el riesgo de enfermedad, tales como alimentos reducidos en grasa o alimentos bajos en sodio, o productos para la pérdida de peso. Por tanto, la presente invención contempla un alimento o bebida que comprende un nutraceutico según la invención.

La memoria descriptiva también describe el uso de un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador en combinación con un antígeno para la preparación de un medicamento, alimento médico o nutraceutico para inducir tolerancia inmunitaria o para tratar una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria. La memoria descriptiva también describe el uso de una composición para la preparación y/o fabricación de un medicamento, alimento médico o nutraceutico para tratar, prevenir y/o aliviar una enfermedad o trastorno que implica una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria, caracterizada porque dicha composición comprende al menos un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador y un antígeno.

La memoria descriptiva también describe el uso de al menos un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador y un antígeno para tratar, prevenir y/o aliviar una enfermedad o trastorno que implica una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria. La memoria descriptiva también describe un método para tratar una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria en un animal que lo necesita, que comprende la administración mucosa de un antígeno en combinación con la administración mucosa de un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador.

La memoria descriptiva también describe una composición que comprende un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador en combinación con un antígeno. Dicha composición puede ser una composición farmacéutica. Dicho antígeno puede ser un alérgeno, aloantígeno, antígeno propio o autoantígeno. Dicho antígeno puede estar implicado en la inducción de asma alérgica, esclerosis múltiple, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, artritis reumatoide, alergia alimentaria o enfermedad celíaca. Según la invención, dicho antígeno es un autoantígeno de células β . También se describe un antígeno que es un antígeno terapéutico, tal como anti-CD3. Preferiblemente, el antígeno según la invención se administra mediante un microorganismo que expresa el antígeno. En este caso, el antígeno puede presentarse en la superficie de dicho microorganismo que expresa el antígeno o puede secretarse por dicho organismo. Preferiblemente, dicha composición se presenta en un pulverizador, una cápsula, un aerosol, pastillas para chupar, un bolo, un comprimido, sobres, un líquido, una suspensión, una emulsión o trociscos, preferiblemente en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo un comprimido, una cápsula o una dosis de aerosol medida. También se da a conocer un compuesto inmunomodulador de la composición descrita en el presente documento que es un anticuerpo o compuesto inmunosupresor. También se describe un compuesto inmunosupresor que es una citocina que potencia la tolerancia o un anticuerpo que potencia la tolerancia, tal como IL-, IFN- α , Flt3L, TGF β y RANK-L. Según la invención, dicho compuesto inmunosupresor es IL-10. También se describe un compuesto inmunosupresor que es un anticuerpo inmunosupresor elegido del grupo que consiste en anti-IL-2, anti-IL12 y anti-IFN- γ . En una realización preferida, el microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador de la composición según la invención es un microorganismo probiótico. En otra realización preferida, el microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador de la composición según la invención es una bacteria o una levadura, preferiblemente dicha bacteria es una bacteria del ácido láctico, incluso más preferiblemente es una bacteria del ácido láctico elegida del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Camobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weisella*, lo más preferiblemente

- dicho *Lactococcus* es *Lactococcus lactis*. Preferiblemente, dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*. Preferiblemente, dicho antígeno y dicho compuesto inmunomodulador de la composición según la invención se expresan por el mismo microorganismo. Preferiblemente, la composición según la invención comprende además un adyuvante, portador y/o excipiente aceptable farmacéutico. Preferiblemente, la composición según la invención comprende además un compuesto que estimula la producción de citocinas inmunosupresoras, preferiblemente dicho compuesto que estimula la producción de citocinas inmunosupresoras es la subunidad B de la toxina del cólera. Preferiblemente, en la composición según la invención, dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador están presentes en una dosis de al menos 10 femtogramos a 100 mg.
- 5
- 10 También se da a conocer un medicamento, nutracéutico o alimento médico para tratar, prevenir y/o aliviar una enfermedad o trastorno que implica una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria que comprende al menos un antígeno en combinación con un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador.
- La memoria descriptiva describe además:
- (1) el uso de un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador en combinación con un antígeno para la preparación de un medicamento, alimento médico o nutracéutico para inducir tolerancia inmunitaria o para tratar una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria en un mamífero;
- 15
- (2) el uso de una composición para la preparación de un medicamento, alimento médico o nutracéutico para tratar, prevenir y/o aliviar una enfermedad o trastorno que implica una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria o para inducir tolerancia inmunitaria en un mamífero, caracterizado porque dicha composición comprende al menos un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador y un antígeno;
- 20
- (3) el uso según (1) ó (2) anterior, en el que dicho mamífero se elige del grupo que consiste en ratón, rata, perro, gato, ganado, caballo, cerdo y ser humano;
- (4) el uso según cualquiera de (1) a (3) anterior, en el que dicha inducción de tolerancia inmunitaria es de al menos 1,5, 2, 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción;
- 25
- (5) el uso según cualquiera de (1) a (4) anterior, en el que dicha inducción de tolerancia inmunitaria se mide mediante la modulación del nivel de una citocina en dicho mamífero;
- (6) el uso según cualquiera de (1) a (5) anterior, en el que dicha modulación es un aumento del nivel de una citocina, en el que dicha citocina se elige del grupo IL-10, TGF- β , IL-4 e IFN α ;
- (7) el uso según (6) anterior, en el que dicho aumento del nivel de una citocina es de al menos 1,5, 2, 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción;
- 30
- (8) el uso según (5) anterior, en el que dicha modulación es una disminución del nivel de una citocina, en el que dicha citocina se elige del grupo IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13 y TNF- α , MCP-1;
- (9) el uso según (8) anterior, en el que dicha disminución del nivel de citocina es de al menos 1,5, 2, 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción;
- 35
- (10) el uso según cualquiera de (1) a (9) anterior, en el que dicho antígeno provoca a una respuesta inmunitaria mediada por células B y/o mediada por células T;
- (11) el uso según (10) anterior, en el que dicha respuesta inmunitaria mediada por células T es una respuesta inmunitaria Th1;
- (12) el uso según (10) anterior, en el que dicha respuesta inmunitaria mediada por células T es una respuesta inmunitaria Th2;
- 40
- (13) el uso según cualquiera de (1) a (12) anterior, en el que dicho antígeno es un alérgeno, aloantígeno, antígeno propio o autoantígeno;
- (14) el uso según cualquiera de (1) a (13) anterior, en el que dicho antígeno está implicado en la inducción de asma alérgica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, artritis reumatoide, alergia alimentaria o enfermedad celíaca;
- 45
- (15) el uso según cualquiera de (1) a (12) anterior, en el que dicho antígeno es un antígeno terapéutico, preferiblemente anti-CD3;
- (16) el uso según cualquiera de (1) a (15) anterior, en el que dicho antígeno se administra mediante un microorganismo que expresa el antígeno;
- 50
- (17) el uso según (16) anterior, en el que dicho antígeno se presenta en la superficie de dicho microorganismo que expresa el antígeno;

- (18) el uso según (16) anterior, en el que dicho antígeno se secreta;
- (19) el uso según cualquiera de (1) a (18) anterior, en el que dicho método es terapéutico;
- (20) el uso según cualquiera de (1) a (18) anterior, en el que dicho método es profiláctico;
- 5 (21) el uso según cualquiera de (1) a (20) anterior, en el que dicha administración mucosa se elige del grupo que consiste en administración rectal, administración bucal, administración pulmonar, administración ocular, administración nasal, administración vaginal y administración oral;
- (22) el uso según cualquiera de (1) a (21) anterior, en el que dicho antígeno y/o dicho microorganismo que expresa compuesto inmunomodulador se administran mediante un pulverizador, una cápsula, un aerosol, pastillas para chupar, un bolo, un comprimido, sobres, un líquido, una suspensión, una emulsión o trociscos;
- 10 (23) el uso según cualquiera de (1) a (22) anterior, en el que dicho antígeno y dicho microorganismo que expresa compuesto inmunomodulador se administran en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo un comprimido, una cápsula o una dosis de aerosol medida;
- (24) el uso según cualquiera de (1) a (23) anterior, en el que dicho antígeno se administra simultáneamente con, separado de o de manera secuencial a dicho microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador;
- 15 (25) el uso según cualquiera de (1) a (24) anterior, en el que dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto inmunosupresor;
- (26) el uso según (25) anterior, en el que dicho compuesto inmunosupresor es una citocina que potencia la tolerancia o un anticuerpo que potencia la tolerancia;
- 20 (27) el uso según (25) anterior, en el que dicho compuesto inmunosupresor es un anticuerpo o citocina inmunosupresora;
- (28) el uso según (27) anterior, en el que dicha citocina inmunosupresora se elige del grupo que consiste en IL-4, IL10, IFN- α , Flt3L, TGF β y RANK-L;
- (29) el uso según (27) anterior, en el que dicho anticuerpo inmunosupresor se elige del grupo que consiste en anti-IL-2, anti-IL12 y anti-IFN- γ ;
- 25 (30) el uso según cualquiera de (1) a (29) anterior, en el que dicho microorganismo es una bacteria o levadura;
- (31) el uso según (30) anterior, es el que dicha bacteria es una bacteria del ácido láctico;
- (32) el uso según (31) anterior, en el que dicha bacteria del ácido láctico se elige del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Weisella*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Teragenococcus* y *Vagococcus*;
- 30 (33) el uso según (32) anterior, en el que dicho *Lactococcus* es *Lactococcus lactis*;
- (34) el uso según (30) anterior, en el que dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*;
- (35) el uso según cualquiera de (30) a (34) anterior, en el que dicho microorganismo es un microorganismo probiótico;
- (36) el uso según cualquiera de (1) a (35) anterior, en el que dicho compuesto inmunomodulador se secreta;
- 35 (37) el uso según cualquiera de (1) a (35) anterior, en el que dicho compuesto inmunomodulador se presenta sobre la superficie del microorganismo;
- (38) el uso según cualquiera de (1) a (37) anterior, en el que dicho antígeno y dicho compuesto inmunomodulador se expresan por el mismo microorganismo;
- 40 (39) el uso según cualquiera de (1) a (38) anterior, en el que dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador comprenden además un adyuvante, portador y/o excipiente farmacéutico aceptable;
- (40) el uso según cualquiera de (1) a (39) anterior, en el que dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador comprenden además un compuesto que estimula la producción de citocinas inmunosupresoras;
- 45 (41) el uso según (40) anterior, en el que dicho compuesto que estimula la producción de citocinas inmunosupresoras es la subunidad B de la toxina del cólera;
- (42) el uso según cualquiera de (1) a (41) anterior, en el que dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de

- compuesto inmunomodulador se administran durante al menos 1 día, preferiblemente durante al menos 1 semana, más preferiblemente durante al menos 1 mes o 1 año;
- (43) el uso según cualquiera de (1) a (42) anterior, en el que dicho antígeno y dicho microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador se administran al menos una vez al día, preferiblemente dos veces al día;
- 5 (44) el uso según cualquiera de (1) a (43) anterior, en el que dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador se administran en una dosis de al menos 10 femtogramos a 100 mg al día;
- (45) una composición que comprende un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador en combinación con un antígeno;
- (46) la composición según (45) anterior, siendo dicha composición una composición farmacéutica;
- 10 (47) la composición según (45) ó (46) anterior, en la que dicho antígeno es un alérgeno, aloantígeno, antígeno propio o autoantígeno;
- (48) la composición según cualquiera de (45) a (47) anterior, en la que dicho antígeno está implicado en la inducción de asma alérgica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, artritis reumatoide, alergia alimentaria o enfermedad celíaca;
- 15 (49) la composición según cualquiera de (45) a (47) anterior, en la que dicho antígeno es un antígeno terapéutico, preferiblemente anti-CD3;
- (50) la composición según cualquiera de (45) a (49) anterior, en la que dicho antígeno se administra mediante un microorganismo que expresa el antígeno;
- 20 (51) la composición según cualquiera de (45) a (50) anterior, en la que dicho antígeno se presenta en la superficie de dicho microorganismo que expresa el antígeno;
- (52) la composición según cualquiera de (45) a (50) anterior, en la que dicho antígeno se secreta;
- (53) la composición según cualquiera de (45) a (52) anterior, en la que dicho antígeno y/o dicho microorganismo que expresa compuesto inmunomodulador se presentan en un pulverizador, una cápsula, un aerosol, pastillas para chupar, un bolo, un comprimido, sobres, un líquido, una suspensión, una emulsión o trociscos;
- 25 (54) la composición según cualquiera de (45) a (53) anterior, en la que dicho antígeno y dicho microorganismo que expresa compuesto inmunomodulador se presentan en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo un comprimido, una cápsula o una dosis de aerosol medida;
- (55) la composición según cualquiera de (45) a (54) anterior, en la que dicho compuesto inmunomodulador es un anticuerpo o compuesto inmunosupresor;
- 30 (56) la composición según (55) anterior, en la que dicho compuesto inmunosupresor es una citocina que potencia la tolerancia o un anticuerpo que potencia la tolerancia;
- (57) la composición según (56) anterior, en la que dicha citocina inmunosupresora se elige del grupo que consiste en IL-4, IL10, IFN- α , Flt3L, TGF β y RANK-L;
- 35 (58) la composición según (56) anterior, en la que dicho anticuerpo se elige del grupo que consiste en anti-IL-2, anti-IL12 y anti-IFN- γ ;
- (59) la composición según cualquiera de (45) a (58) anterior, en la que dicho microorganismo es un microorganismo probiótico;
- (60) la composición según cualquiera de (45) a (59) anterior, en la que dicho microorganismo es una bacteria o levadura;
- 40 (61) la composición según (60) anterior, en la que dicha bacteria es una bacteria del ácido láctico;
- (62) la composición según (61) anterior, en la que dicha bacteria del ácido láctico se elige del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Weisella*, *Aerococcus*, *Camobacterium*, *Teragenococcus* y *Vagococcus*;
- (63) la composición según (62) anterior, en la que dicho *Lactococcus* es *Lactococcus lactis*;
- 45 (64) la composición según (60) anterior, en la que dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*;
- (65) la composición según cualquiera de (45) a (64) anterior, en la que dicho antígeno y dicho compuesto inmunomodulador se expresan por el mismo microorganismo;

(66) la composición según cualquiera de (45) a (65) anterior, que comprende además un adyuvante, portador y/o excipiente farmacéutico aceptable;

(67) la composición según cualquiera de (45) a (66) anterior, que comprende además un compuesto que estimula la producción de citocinas inmunosupresoras;

5 (68) la composición según (67) anterior, en la que dicho compuesto que estimula la producción de citocinas inmunosupresoras es la subunidad B de la toxina del cólera;

(69) la composición según cualquiera de (45) a (68) anterior, en la que dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador están presentes en una dosis de al menos 10 femtogramos a 100 mg;

10 (70) un método para inducir tolerancia inmunitaria frente a un antígeno en un animal, que comprende la administración mucosa de dicho antígeno, en combinación con la administración mucosa de un microorganismo que expresa molécula inmunomoduladora;

(71) un método para tratar una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria en un mamífero que lo necesita, que comprende la administración mucosa de un antígeno en combinación con la administración mucosa de un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador; y

15 (72) un medicamento, nutracéutico o alimento médico para tratar, prevenir y/o aliviar una enfermedad o trastorno que implica una enfermedad relacionada con respuesta inmunitaria o inducir tolerancia inmunitaria que comprende al menos un antígeno en combinación con un microorganismo secretor de compuesto inmunomodulador.

Además, todos los términos usados en la descripción de compuestos de la presente invención tienen su significado tal como se conoce bien en la técnica.

20 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Respuestas inmunitarias proliferativas en los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales (PLN/ILN) tras la alimentación oral con *L. lactis* GM o proteína ovoalbúmina (OVA) a ratones Balb/c. Se midieron respuestas proliferativas específicas de OVA 11 días tras la exposición subcutánea (en el día 0) de los ratones con OVA en adyuvante completo de Freund. Los ratones recibieron suspensión de *L. lactis* mezclada en los días -46 hasta -42, -39 hasta -35, -32 hasta -28, -25 hasta -21, -18 hasta -14, -11 hasta -7, -4 hasta -1. LLpT: suspensión bacteriana mezclada de LL-pT1 NX (control de vector) y LL-pT1 NX; LL-OVA: suspensión bacteriana mezclada de la cepa de *L. lactis* que secreta ovoalbúmina y LL-pT1 NX; LL-OVA+LL-mIL10: suspensión bacteriana mezclada de LL-OVA y la cepa de *L. lactis* que secreta interleucina-10 murina. El control positivo 1 recibió 20 mg de OVA en el día -7. El control positivo 2 recibió 1 µg de OVA en los mismos días que la alimentación de *L. lactis*. Los resultados mostrados son la incorporación de [³H]-timidina media en cpm (± DE) para cultivos por triplicado de células agrupadas de grupos con 4 ratones.

Figura 2. Respuestas de citocinas en los MLN y PLN/ILN tras la alimentación oral con *L. lactis* GM u OVA a ratones Balb/c. Se evaluó la secreción de IL-12p70 (a), TNF-α (b), IFN-γ (c), MCP-1 (d), IL-10 (e) e IL-6 (f) en ratones control y ratones alimentados con *L. lactis* GM u OVA. Se sometieron a prueba sobrenadantes de cultivo celular de células de MLN (A) y PLN/ILN (B) tras la reestimulación con OVA 300 µg/ml *in vitro*, para determinar la presencia de citocinas mediante CBA (BD Bioscience), usando el kit de inflamación de ratón. Los resultados mostrados son las producciones de citocinas por células agrupadas de grupos con 4 ratones.

Figura 3. Respuestas de células T CD4+ proliferativas específicas de OVA en los PLN/ILN tras la alimentación oral con *L. lactis* GM o proteína ovoalbúmina (OVA) a ratones Balb/c. Se midieron respuestas proliferativas específicas de OVA 11 días tras la exposición subcutánea (en el día 0) de los ratones con OVA en adyuvante completo de Freund. Los ratones recibieron suspensión de *L. lactis* mezclada en los días -46 hasta -42, -39 hasta -35, -32 hasta -28, -25 hasta -21, -18 hasta -14, -11 hasta -7, -4 hasta -1. LL-pT: suspensión bacteriana mezclada de LL-pT1NX (control de vector) y LL-pT1NX; LL-OVA: suspensión bacteriana mezclada de la cepa de *L. lactis* que secreta ovoalbúmina y LL-pT1NX; LL-OVA+LL-mIL10: suspensión bacteriana mezclada de LL-OVA y la cepa de *L. lactis* que secreta interleucina-10 murina. El control positivo 1 recibió 20 mg de OVA en el día -7. El control positivo 2 recibió 1 µg de OVA en los mismos días que la alimentación de *L. lactis*. Los resultados mostrados son la incorporación de [³H]-timidina media en cpm (± DE) para cultivos por triplicado de células agrupadas de grupos con 4 ratones.

Ejemplos

50 Ejemplo A: Inducción de tolerancia a ovoalbúmina tras la administración oral de *L. lactis* que secreta dicha ovoalbúmina en combinación con IL-10 administrada *in situ*.

Materiales y métodos para los ejemplos

Bacterias y plásmidos

Se usó la cepa MG1363 de *L. lactis* a lo largo de todo este estudio. Se cultivaron las bacterias en medio GM17, es

decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con glucosa al 0,5%. Se almacenaron las suspensiones madre de todas las cepas a -20°C en glicerol al 50% en GM17. Para inoculaciones intragástricas, se diluyeron las suspensiones madre 500 veces en GM17 nuevo y se incubaron a 30°C. Alcanzaron una densidad de saturación de 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en el plazo de 16 horas. A lo largo de todo este estudio, se usaron suspensiones bacterianas mezcladas. Por tanto, se recogieron las bacterias que tienen que mezclarse mediante centrifugación y se concentraron los sedimentos de ambos cultivos bacterianos 10 veces en medio BM9 (Schotte, *et al.*, 2000). Para el tratamiento, cada ratón recibió 100 μ l de esta suspensión mediante catéter intragástrico.

Se recuperó la secuencia de ARNm que codifica para ovoalbúmina de *Gallus gallus* de Genbank (número de registro AY223553). Se aisló ARN total de útero de pollo y se sintetizó ADNc usando 2 μ g de ARN total, cebadores de oligo dT 2 μ M (Promega Corporation Benelux, Leiden, Países Bajos), DTT 0,01 mM (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos), dNTP 0,5 mM (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica), 20 U de Rnasin (Promega Incorporation Benelux) y 100 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) en un volumen de 25 μ l. Se amplificó el fragmento de ADNc de OVA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando las siguientes condiciones: 94°C durante 2 min. seguido por 30 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos, con los siguientes cebadores directo e inverso 5'-GGCTCCATCGGTGCAGCAAGCATGGAATT-3' y 5'-ACTAGTTAAGGGGAAACACATCTGCCAAGAAGAGAA-3'.

Se fusionó el fragmento amplificado a la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, en el sentido de 3' del promotor P1 de lactococos. Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portan ADNc de OVA e IL-10 se designaron *L. lactis* que secreta OVA (LL-OVA) y LL-IL10. La *L. lactis*-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío, pT1 NX, sirvió como control (LL-pT1 NX).

Animales

Se obtuvieron ratones Balb/c hembra de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories (Italia). Se alojaron en condiciones SPF y se alimentaron con pienso de laboratorio convencional y agua corriente a voluntad. Se aprobaron los estudios con animales por el Comité de Ética del Departamento de Investigación Biomédica Molecular, Universidad de Gante.

Inducción y evaluación de la tolerancia oral

Los ratones recibieron suspensión de *L. lactis* mezclada en los días -46 hasta -42, -39 hasta -35, -32 hasta -28, -25 hasta -21, -18 hasta -14, -11 hasta -7, -4 hasta -1. LL-pT: suspensión bacteriana mezclada de LL-pT1NX (control de vector) y LL-pT1NX; LL-OVA: suspensión bacteriana mezclada de la cepa de *L. lactis* que secreta ovoalbúmina y LL-pT1NX; LL-OVA+LL-mIL10: suspensión bacteriana mezclada de LL-OVA y la cepa de *L. lactis* que secreta interleucina-10 murina. Se incluyeron dos controles positivos para la inducción de tolerancia oral en el estudio. El control positivo 1 recibió 20 mg de ovoalbúmina en 100 μ l de medio BM9 en el día -7. El control positivo 2 recibió 1 μ g de ovoalbúmina en 100 μ l de medio BM9 en los mismos días que la alimentación de *L. lactis*. Los ratones recibieron alimentaciones por vía intragástrica mediante catéter. Los ratones control no se trataron por vía oral. En el día 0, se inmunizaron los ratones por vía s.c. con 100 μ g de OVA emulsionada 1:1 en adyuvante completo de Freund que contenía 100 μ g de *M. tuberculosis* H37 RA (Difco). Once días tras la inmunización, se recogieron los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales (PLN/ILN) y se evaluaron las células para determinar la producción de citocinas y proliferación específica de OVA.

Proliferación específica de OVA in vitro

Se prepararon suspensiones de células individuales de los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales drenantes. Se contaron las células y se resuspendieron a 2×10^5 células en 200 μ l de RPMI-1640 que contenía suero de ternero fetal (FCS) al 10%, penicilina 10 U/ml, estreptomina 10 μ g/ml, L-glutamax 2 mM, piruvato de sodio 0,4 mM (RPMI completo) o bien solo o bien con OVA 11, 33, 100 ó 300 μ g/ml. Se cultivaron las células durante 90 horas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U (Becton Dickinson) a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂. Se evaluó la proliferación mediante la adición de [³H]-timidina 1 μ Ci/pocillo durante las últimas 18 horas de cultivo. Se recogió la radiactividad unida al ADN sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer) y se midió la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

Proliferación específica de OVA de células T purificadas CD4 in vitro

Se purificaron células T CD4+ a partir de preparaciones de células completas de PLN/ILN usando el kit de aislamiento de células T CD4+ (Miltenyl Biotec). Se cultivaron 2×10^5 células T CD4+ en 200 μ l de RPMI completo con esplenocitos tratados con mitomicina C cargados con OVA, que actúan como células presentadoras de antígeno a razones de células T CD4+/APC de 1/3, 1/1, 1/0,3, 1/0,1 y 1/0. Se cultivaron las células durante 90 horas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U (Becton Dickinson) a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂. Se evaluó la proliferación mediante la adición de [³H]-timidina 1 μ Ci/pocillo durante las últimas 18 horas de cultivo. Se recogió la radiactividad unida al ADN sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer) y se midió la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

Medición de la producción de citocinas específica de OVA

Se prepararon células de ganglios linfáticos de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales drenantes y se resuspendieron a 2×10^6 células/ml y se cultivaron alícuotas de 100 μ l en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U durante 72 horas con OVA 300 μ g/ml. Se almacenaron los sobrenadantes a -20°C hasta que se cuantificaron los niveles de citocinas mediante la matriz de perlas citométricas usando el kit de inflamación de ratón (BD Bioscience).

Ejemplo A1: LL-IL10 potencia significativamente la capacidad de inducción de tolerancia de LL-Ova.

Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentaron por vía oral los ratones con *L. lactis* GM [LL-pt: suspensión bacteriana mezclada de LL-pT1NX [todo] (= control de vector) y LL-pT1NX; LL-OVA: suspensión bacteriana mezclada de *L. lactis* que secreta OVA [todo en cursiva] y LL-pT1NX; LL-OVA+LL-mIL-10: suspensión bacteriana mezclada de *L. lactis* que secreta OVA y *L. lactis* que secreta IL-10] 6 veces 5 días consecutivos (en los días -46 hasta -42, -39 hasta -35, -32 hasta -28, -25 hasta -21, -18 hasta -14, -11 hasta -7 y -4 hasta -1) o una dosis única de 20 mg de OVA en el día -7 [control positivo 1] o dosis frecuentes de 1 μ g de OVA en los mismos días que la alimentación de *L. lactis* [control positivo 2]. Los ratones control no se trataron por vía oral. En el día 0, se inmunizaron los ratones por vía s.c. con OVA en adyuvante completo de Freund y se evaluó la proliferación específica de OVA de las células de PLN/ILN en el día 11. La adición de LL-IL-10 potenció significativamente la inducción de tolerancia hacia OVA ya que la respuesta proliferativa específica de OVA de las células PLN/ILN (figura 1) se redujo significativamente en el grupo de LL-OVA [todo]+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-ova y control.

Ejemplo A2: LL-IL10 potencia la tolerancia oral en asociación con la producción reducida de citocinas proinflamatorias en respuesta a Ova.

Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentaron los ratones por vía oral con *L. lactis* GM u OVA tal como se describió anteriormente (ejemplo 1) y se inmunizaron posteriormente por vía s.c. con OVA en adyuvante completo de Freund. Once días tras la inmunización, se cuantificó la producción de citocinas en respuesta a OVA en los MLN y PLN/ILN mediante la matriz de perlas citométricas, usando el kit de inflamación de ratón. En los MLN, no se detectó la producción de las citocinas proinflamatorias, IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-6 o se redujo fuertemente en el grupo de LL-ova+LL-mIL-10 en comparación con el grupo de LL-ova en el que se observó una fuerte producción de estas citocinas proinflamatorias (figura 2A). En los PLN, la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IFN- γ , MCP-1 e IL-6 se reduce fuertemente en el grupo de LL-ova+LI mIL-10 en comparación con el grupo de LL-ova y en este grupo los niveles de TNF- α , MCP-1 e IL-6 son inferiores a los observados en el grupo control (figura 2B).

Ejemplo A3: LL-IL10 potencia la tolerancia oral mediante células T CD4+.

Para evaluar si la inducción de tolerancia oral estaba mediada por células T CD4+ [todo], se estudió la respuesta de células T CD4 proliferativa en los MLN y PLN/ILN. Por tanto, se alimentaron los ratones por vía oral con *L. lactis* GM u OVA en los días indicados anteriormente (ejemplo 1). Se inmunizaron los ratones por vía s.c. con OVA en adyuvante completo de Freund en el día 0 y 11 días más tarde se purificaron las células T CD4 de los MLN y PLN/ILN y se cultivaron posteriormente en presencia de esplenocitos tratados con mitomicina C cargados con OVA. La respuesta de células T CD4 específica de OVA en el grupo de LLova+LL-mIL-10 se redujo significativamente en comparación con los grupos de LL-ova y control (figura 3).

Ejemplo B: Inducción de tolerancia al factor VIII y factor IX de coagulación tras la administración oral de *L. lactis* que secreta dichos factores en combinación con IL-10 administrada *in situ*.

Introducción

Varias proteínas terapéuticas (recombinantes), tales como interferones, factor VIII/IX y anticuerpos (Remicade) se administran a altas dosis a lo largo de periodos de tratamiento prolongados. Sin embargo, una complicación asociada con su uso es el desarrollo de respuestas inmunitarias específicas de proteínas, tales como anticuerpos. Estos anticuerpos (Ac), también denominados inhibidores, hacen que las proteínas terapéuticas sean menos eficaces. Los ejemplos incluyen la formación de inhibidores para el factor VIII/IX en hemofilia, eritropoyetina (Epo) en pacientes que se someten a terapia para insuficiencia renal crónica e IFN- β en pacientes que se someten a tratamiento para esclerosis múltiple. En el presente documento, se demuestra que la administración oral del factor VIII (y el factor IX) en combinación con *L. lactis* que produce IL-10 suprime la formación de inhibidores para dicho factor mediante la inducción de células T reguladoras CD4⁺ específicas de antígeno.

Materiales y métodos para los ejemplos

Bacterias y plásmidos

Se usa la cepa MG1363 de *L. lactis* a lo largo de todo este estudio. Se cultivan las bacterias en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con glucosa al 0,5%. Se almacenan las suspensiones madre de todas las cepas a -20°C en glicerol al 50% en GM17. Para inoculaciones intragástricas, se diluyen las

suspensiones madre 200 veces en GM17 nuevo y se incuban a 30°C. Alcanzan una densidad de saturación de 2 x 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en el plazo de 16 horas. A lo largo de todo este estudio, se usan suspensiones bacterianas mezcladas. Por tanto, las bacterias que se mezclan se recogen mediante centrifugación y se concentran los sedimentos de ambos cultivos bacterianos 10 veces en medio BM9 (Schotte, Steidler *et al.* 2000).
5 Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 µl de esta suspensión mediante catéter intragástrico.

Se amplifican fragmentos de ADNc o ADNc de FVIII y FIX humanos, que representan epítomos de células T CD4+ específicos de FVIII y FIX, fusionados a la señal de secreción Usp45 del vector pT1 NX resistente a eritromicina, en el sentido de 3' del promotor P1 de lactococos.

10 Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portan IL-10 murina, FVIII (y/o fragmento de epítomo), FIX (y/o fragmento de epítomo), se designaron *L. lactis* que secreta IL10, LL-IL10, LL-FVIII, LL-FIX. LL-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1NX, sirve como control.

Cuantificación de FVIII y FIX

15 Se determinan FVIII o FIX a partir de LL-FVIII y LL-IX, respectivamente, usando ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) específico de FVIII y FIX, que se ha descrito anteriormente (Chuah *et al.*, 2003). También se analizaron las proteínas recombinantes mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western y ensayos de aPTT y COATests, tal como se describe (Chuah *et al.*, 2003; VandenDriessche *et al.*, 1999). Se determina el extremo NH₂-terminal de esta proteína mediante degradación de Edman automatizada. Puesto que FVIII y FIX se expresan normalmente en el hígado en el que experimentan modificaciones postraduccionales extensas, los factores de coagulación producidos a partir de la *L. lactis* modificada por ingeniería genética pueden ser biológicamente
20 inactivos. Sin embargo, estas diferencias postraduccionales probablemente no tendrán repercusiones sobre la capacidad de estas proteínas recombinantes producidas por *L. lactis* para inducir tolerancia inmunitaria. De hecho, la mayoría de los inhibidores que se han caracterizado en detalle hasta la fecha reconocen normalmente residuos de aminoácido (Villard *et al.*, 2003), en vez de restos glicosilados.

Animales

25 Se crían en el laboratorio ratones con hemofilia A o B obtenidos desactivando los genes de FVIII o FIX murinos usando recombinación homóloga en células ES tal como se describe por (Bi *et al.*, (1995) y Wang *et al.*, (1997). Estos ratones receptores generan anticuerpos neutralizantes cuando se exponen con antígeno de FVIII o FIX recombinante purificado en presencia de CFA (Mingozzi *et al.*, 2003). Puede monitorizarse el estado de inhibidores a lo largo del tiempo usando ensayos de Bethesda o ELISA específicos de anti-FVIII/anti-FIX. Los ratones receptores
30 expuestos con FVIII o FIX (+CFA) desarrollan normalmente inhibidores 2-3 semanas después de la exposición antigénica.

Entorno experimental

35 Ratones de 4-6 semanas de edad reciben LL-FVIII, LL-FIX, o LL-pT1NX o LL-OVA (un antígeno irrelevante) o bien como controles negativos, combinados o no con LL-IL10 o bien proteína de IL-10 (1 ó 10 µg). Como control positivo para la inducción de tolerancia, se inyectaron a los ratones vectores virales adenoasociados (VAA) que expresan FIX a partir de un promotor específico de hepatocitos. Los animales receptores desarrollan tolerancia inmunitaria específica de FIX que previene la inducción de anticuerpos anti-FIX tras la exposición posterior con FIX+CFA.

40 En un entorno profiláctico, se administran por vía oral LL-FVIII, LL-FIX solo o junto con LL-IL10 o IL-10 a ratones con hemofilia A o B usando un catéter gástrico, usando diferentes intervalos de tratamiento y dosis. Estos ratones receptores se exponen posteriormente con antígeno de FVIII o FIX recombinante purificado, en presencia de CFA (Mingozzi *et al.*, 2003). Los animales control se exponen a LL-pT1NX y LL-OVA. Se recoge plasma mediante hemorragia retroorbital. Se evalúa el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra FVIII o FIX usando ensayos de Bethesda (Kasper *et al.*, 1975) o usando un ELISA específico de anti-FVIII o anti-FIX modificado (VandenDriessche *et al.*, 1999) a diferentes intervalos de tiempo.

45 En un entorno terapéutico, se inmunizan en primer lugar ratones con hemofilia A o B con FVIII o FIX, tal como se describe (Mingozzi *et al.*, 2003). Se monitoriza el estado de inhibidores a lo largo del tiempo usando ensayos de Bethesda o ELISA específicos de anti-FVIII/anti-FIX. Se tratan posteriormente ratones con títulos de inhibidores bajos o altos con LL-FVIII, LL-FIX solo o junto con LL-IL10 o IL-10 usando diferentes intervalos de tratamiento y dosis y se determinan los títulos de inhibidores a lo largo del tiempo. Se evalúa la especificidad de la posible
50 tolerancia inmunitaria exponiendo los ratones que reciben LL-FVIII, LL-FIX solo o junto con LL-IL10 con un antígeno irrelevante (toxoides tetánico u Ova). Como control positivo, se exponen los ratones por vía oral con FVIII o FIX purificado.

Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas

55 Se preparan suspensiones de células individuales de ganglios linfáticos y bazo haciendo pasar las células a través de tamices celulares filtrantes de 70 µm (Becton/Dickinson Labware). Se eliminan los eritrocitos de las suspensiones de células de bazo mediante incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos.

5 Para los ensayos de proliferación de poblaciones de esplenocitos totales, se cultivan 2×10^5 células en placas con fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 μ l de medio completo o bien solas o bien con FVIII o FIX purificado, y o bien con o bien sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF- β . Se añaden FVIII y FIX a concentraciones que oscilan entre 1 y 100 μ g/ml. Se añaden los anticuerpos neutralizantes a 1, 0,1 y 0,01 μ g/ml. Para los ensayos de proliferación de células T CD4⁺ y poblaciones de células T CD4⁺CD25⁻, se cultivan 0,2 x 10⁵ células T CD4⁺ o células CD4⁺CD25⁻ en placas con fondo en U de 96 pocillos con 1 x 10⁵ células CD4⁺ irradiadas, que actúan como células presentadoras de antígeno, y FVIII o FIX (0 ó 100 μ g/ml) en un volumen total de 200 μ l de medio completo o bien con o bien sin anticuerpos neutralizantes. Tras 72 h a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂, se evalúa la proliferación mediante la adición de [³H]-timidina 1 μ Ci/pocillo. Se recoge la radiactividad unida al ADN 16-18 h más tarde sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y se mide la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

10 Para mediciones de citocinas, se recogen los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación tras 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelan a -20°C hasta que se realiza el análisis de citocinas. Se cuantifica la producción de citocinas usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.).

15 *Ensayo de actividad reguladora T in vivo*

20 Con el fin de someter a prueba la supresión activa de la formación de anticuerpos en ratones, se transfieren de manera adoptiva esplenocitos, células T CD4⁺, células T CD4⁺CD25⁻ o CD4⁺CD25⁺ purificadas en perlas, aislados de los diferentes grupos experimentales tratados con *L. lactis*, a ratones C3H/HeJ sin tratamiento previo. Se usan ratones no tratados como control. El número de células transferidas es de 10⁷ para células de bazo completas, células de bazo reducidas en una subpoblación o células T CD4⁺CD25⁻ y CD4⁺CD25⁺ y células CD4⁺ seleccionadas positivamente. Se inyectaron por vía subcutánea a ratones receptores (n=4-5 por cohorte experimental) 5 μ g de hF.IX en cFA 36 horas tras la transferencia adoptiva. Se midieron los títulos de IgG anti-hF.IX en plasma 2,5 semanas tras la inmunización.

25 Ejemplo B1: LL-IL10 potencia significativamente la capacidad de inducción de tolerancia de LL-FVIII y LL-IX en ratones con hemofilia A o B.

30 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). La adición de LL-IL-10 potencia significativamente la inducción de tolerancia hacia FVIII y FIX ya que la respuesta proliferativa específica de factor de los esplenocitos se reduce significativamente en el grupo de LL-FVIII/FIX+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-FVIII/IX y control.

Ejemplo B2: LL-IL10 potencia la tolerancia oral en asociación con títulos específicos de FVIII y FIX reducidos y producción de IFN- γ y más de IL10 y TGF- β en respuesta a dicho factor.

35 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). Se cuantifican tal como se describió anteriormente la producción de citocinas y anticuerpos específicos de FVIII y FIX en respuesta a dicho factor en esplenocitos y ganglios linfáticos. La formación de inhibidores y la producción de la citocina proinflamatoria IFN- γ se reducen fuertemente y las citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β aumentan significativamente en el grupo de LL-FVIII/FIX+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-FVIII/IX y control.

Ejemplo B3: LL-IL10 potencia la tolerancia oral mediante células T CD4⁺.

40 Para evaluar si las células T CD4⁺ median la inducción de tolerancia oral, se estudia la respuesta de células T CD4⁺ proliferativa específica de factor en los esplenocitos y ganglios linfáticos. Por tanto, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*) y se determina la proliferación de células T CD4⁺ específica de factor tal como se describió en *Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas*. La respuesta de células T CD4⁺ específica de factor en el grupo de LL-FVIII/FIX+LL-mIL-10 se reduce significativamente en comparación con los grupos de LL-FVIII/IX y control.

45 Ejemplo B4: IL-10 es menos eficaz que LL-IL10 en la potenciación de la tolerancia oral

50 Para evaluar si LL-IL10 es tan eficaz como IL-10, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). Se estudia la respuesta de células T CD4⁺ proliferativa específica de factor en los esplenocitos y ganglios linfáticos. La respuesta de células T CD4⁺ específica de factor en el grupo de LL-FVIII/FIX+LL-mIL-10 se reduce significativamente en comparación con el grupo de LL-FVIII/IX + IL-10.

Ejemplo B5: Células reguladoras T inducidas por antígeno tras la terapia de combinación con LL-FVIII/FIX-LL-IL10 pueden transferir protección frente a la formación de inhibidores *in vivo*

55 Con el fin de someter a prueba la supresión activa de la formación de anticuerpos en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, se transfieren de manera adoptiva esplenocitos de los diferentes grupos tratados tal como se describió anteriormente (*Ensayo de actividad reguladora T in vivo*). En comparación con los controles y los

grupos de LL-FVIII/IX, la formación de IgG anti-factor se reduce significativamente en el grupo de LL-FVIII/IX+LLmIL-10, lo que indica activación de células T CD4⁺ reguladoras en el protocolo de tolerancia oral de combinación.

5 Ejemplo C: Inducción de tolerancia a un alérgeno, Der p 1, tras la administración oral de *L. lactis* que secreta dicho alérgeno en combinación con IL-10 administrada *in situ*

Introducción

10 El asma alérgica es un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias. Se caracteriza por obstrucción reversible de las vías respiratorias, niveles séricos elevados de inmunoglobulina E específica de alérgeno, hipersecreción de moco e hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) a estímulos broncoespasmogénicos. Sus síntomas se empeoran por la exposición a un alérgeno (por ejemplo, polen de árboles, hierbas y césped, polvo y ácaros del polvo, moho, caspa animal) al que el paciente se ha sensibilizado. Los linfocitos auxiliares T de tipo 2 (Th2) desempeñan un papel crucial en el inicio, la progresión y la persistencia de la enfermedad. Datos actuales sugieren que las respuestas Th2 a alérgenos se suprimen normalmente por células T reguladoras. Además, la supresión por este subconjunto disminuye en individuos alérgicos. En el presente documento, se demuestra que la administración oral de alérgeno en combinación con *L. lactis* que produce IL-10 suprime respuestas de tipo asma mediante la inducción de células T reguladoras CD4⁺ específicas de antígeno.

Materiales y métodos para los ejemplos

Dos modelos de ratón de asma alérgica que imita a la enfermedad humana son el modelo de alérgeno Ova y el modelo SCID humanizado.

20 El modelo de alérgeno Ova

Se exponen mediante inhalación ratones sensibilizados a OVA con aerosol de OVA que conduce a inflamación eosinofílica de las vías respiratorias dependiente de citocinas Th2, hiperreactividad bronquial y producción de IgE, hallazgos ampliamente característicos del asma alérgica humana (Brusselle, 1994, Clin Exp Allergy 24:73; Kips *et al.* 1996, Am J Respir Crit Care Med 153:535; Brusselle *et al.* 1995, Am J Respir Cell Mol Biol 12:254).

25 **Bacterias**

Se usa la cepa MG1363 de *L. lactis* a lo largo de todo este estudio. Se cultivan las bacterias en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con glucosa al 0,5%. Se almacenan las suspensiones madre de todas las cepas a -20°C en glicerol al 50% en GM17. Para inoculaciones intragástricas, se diluyen las suspensiones madre 200 veces en GM17 nuevo y se incuban a 30°C. Alcanzaron una densidad de saturación de 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en el plazo de 16 horas. Se recogen las bacterias mediante centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 μ l de esta suspensión diariamente mediante catéter intragástrico.

Plásmidos

35 Se recupera la secuencia de ARNm que codifica para ovoalbúmina de *Gallus gallus* de Genbank (número de registro AY223553). Se aísla ARN total de útero de pollo y se sintetiza ADNc usando 2 μ g de ARN total, cebadores de oligo dT 2 μ M (Promega Corporation Benelux, Leiden, Países Bajos), DTT 0,01 mM (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos), dNTP 0,5 mM (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica), 20 U de Rnasin (Promega Incorporation Benelux) y 100 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) en un volumen de 25 μ l. Se amplifica el fragmento de ADNc de OVA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando las siguientes condiciones: 94°C durante 2 min. 40 seguido por 30 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos, con los siguientes cebadores directo e inverso 5'-GGCTCCATCGGTGCAGCAAGCATGGAATT-3' y 5'-ACTAGTTAAGGGGAAAC-ACATCTGCCAAAGAAGAGAA-3'.

Se fusiona el fragmento amplificado a la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, en el sentido de 3' del promotor P1 de lactococos.

45 Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portan IL-10 murina y ADNc de OVA se designan LL-IL10 y LL-OVA. LL-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1NX, sirve como control.

Cuantificación de OVA

50 Se determina OVA a partir de LL-OVA usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) específico de OVA desarrollado en el laboratorio. También se evalúa la producción de las proteínas recombinantes mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

El modelo de alérgeno OVA

Ratones

Se adquieren ratones BALB/c (de 6 a 8 semanas de edad) de Charles River Laboratories (Calco, Italia). Se mantienen los ratones en condiciones libres de patógenos específicos.

Inmunización de los ratones

5 Se inmunizan los ratones por vía i.p. con 2 µg de OVA (calidad V; Sigma-Aldrich) en 2 mg de hidróxido de aluminio (alumbre). Se repite esta inmunización tras un intervalo de 10 días (en los días 0 y 10). Los ratones control reciben una inyección de solución salina en lugar de la disolución de OVA/alumbre. Siete días tras la inmunización, los ratones sensibilizados inhalan una disolución aerosolizada de OVA al 3% disuelta en PBS durante 10 min. Se realiza la inhalación de OVA durante 3 días en una fila (días 18, 19, y 20). Los ratones control inhalan PBS solo en las mismas condiciones usadas para el grupo experimental.

10 *Inducción de tolerancia oral*

Los ratones reciben LL-OVA sola o combinada con IL-10 (1 ó 10 µg) o LL-IL10, LL-IL10 sola, IL-10 sola (1 ó 10 µg), LL-pT1NX o agua (control no alimentado). En un entorno profiláctico, se alimentan los ratones durante 2 regímenes diferentes antes de la primera inmunización por vía i.p. Los regímenes de alimentación 1 y 2 consisten en 4 y 6 ciclos de administración diaria durante 5 días, alternando con un periodo de 2 días sin administración, respectivamente. Como controles positivos para la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones con 1 mg (dosis baja) o 30 mg (dosis alta) de OVA cada dos días desde 10 hasta 2 días antes de la primera inmunización (cinco alimentaciones en total) mediante catéter intragástrico que reduce la eosinofilia bronquial y la hiperreactividad de las vías respiratorias, siendo más eficaz la alimentación a alta dosis que la alimentación a baja dosis.

20 En un entorno terapéutico, se alimentan los ratones diariamente con las mismas cepas de *L. lactis* descritas para el entorno profiláctico, comenzando sólo desde la primera inmunización hasta 8 días tras la inmunización.

Como control positivo para la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones con 30 mg de OVA.

Medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR)

25 24 h tras la inhalación final (día 21), se evalúa la hiperreactividad de las vías respiratorias mediante obstrucción del flujo de aire inducido por metacolina. Se exponen los ratones durante 2,5 min. a solución salina fisiológica nebulizada (Otsuka Pharmaceutical), seguido por dosis en aumento (1-30 mg/ml) de metacolina nebulizada. Se colocan estos ratones en un pletismógrafo de cuerpo completo durante 2,5 min. tras la nebulización, y se mide la pausa potenciada (Penh) usando el sistema Biosystem XA WBP (Buxco Electronics). "Penh" representa la obstrucción del flujo de aire pulmonar y se calcula usando la fórmula: $Penh = ((Te - Tr)/(Tr \times PEF/PIF))$, en la que Penh = pausa potenciada (adimensional), Te = tiempo espiratorio (segundos), Tr = tiempo de relajación (segundos), PEF = flujo espiratorio pico (milímetros por segundo) y PIF = flujo inspiratorio pico (milímetros por segundo). Se mide Penh y se calcula el promedio aproximadamente cada 5 s, y se calcula el promedio de los valores acumulativos como el valor de Penh para cada punto de tiempo. Se expresa la hiperreactividad de las vías respiratorias como PC200Mch (concentración estimulante al 200% de metacolina), que es la concentración de metacolina que dobla el valor de Penh inicial.

35 *Análisis de fluido de lavado broncoalveolar (BALF)*

Tras la medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias, se obtienen muestras de lavado broncoalveolar. Se anestesian los ratones mediante inyección por vía i.p. de ketamina 100 mg/kg y xilazina 10 mg/kg, y entonces se lavan los pulmones con 0,5 ml de solución salina cuatro veces. Se centrifuga el fluido de lavado y se resuspenden las células en 1 ml de solución salina con BSA al 1%. Se cuentan los números de células totales usando un hemocitómetro. Se preparan muestras de citocentrifugación centrifugando las suspensiones a 300 rpm durante 5 min. Para distinguir claramente los eosinófilos de los neutrófilos, se aplican tres tinciones diferentes: tinciones Diff-Quick, May-Grünwald-Giemsa y Hansel (eosina). Se diferencian al menos 300 leucocitos mediante microscopía óptica basándose en criterios morfológicos convencionales. Se detecta el nivel de IL-13, IL-4 e IL-5 en BALF mediante ensayo de perlas citométricas (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Medición de Ig específica de OVA e IgE total sérica

50 En el día 21, se obtienen muestras de sangre del seno retroorbital bajo anestesia. Después de que las muestras se hubiesen coagulado completamente, se centrifugan, y se recoge el suero y se almacena a -80°C hasta su uso. Se somete a ensayo la IgE total mediante ELISA usando Ac apareados (BD Pharmingen) según las instrucciones del fabricante. Para medir IgG2a, IgG1 e IgE específica de OVA en sueros, se recubren placas de microtitulación (Maxisorp, Nunc, VWR International, Haasrode, Bélgica) con OVA 2 µg/ml. Posteriormente, se bloquean los pocillos con caseína al 0,1% en PBS, tras lo cual se incuban las placas con muestras de suero de ratón diluido de 1:10 a 1:20480 en PBS que contiene caseína al 0,1% y Tween 20 al 0,05% (PBS-CT), con IgG2a-HRP de cabra anti-ratón [Southern Biotechnology Associates (SBA), Imtec ITK Diagnostics, Amberes, Bélgica, dilución 1: 5000], IgG1-HRP de cabra anti-ratón o IgE-HRP de cabra anti-ratón (SBA, dilución 1:5000). Tras lavar, se añade el sustrato [reactivo de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), Pharmingen, Becton Dickinson, Erembodegem, Bélgica] a cada

pocillo. Finalmente, se detienen las reacciones añadiendo H_2SO_4 1 M a los pocillos. Se leen las absorbancias a 450 nm. Se expresan las puntuaciones de ELISA como títulos, que son la inversa de la dilución más alta que tenía todavía una DO_{450} superior al valor de punto de corte calculado. El punto de corte se calcula como la DO_{450} media de 5 ratones no inmunizados aumentada con tres veces la DE.

5 Examen histológico de tejido pulmonar

Tras obtener muestras de lavado broncoalveolar, se perfunden los pulmones con solución salina fisiológica y se extirpan de los ratones. Se fijan los pulmones con formalina tamponada neutralizada y se incrustan en parafina. Se tiñen secciones (3 μm de grosor) con H&E o ácido peryódico-Schiff (PAS). Se evalúa la intensidad de los cambios histológicos en los pulmones con cuatro puntuaciones de clasificación (0, sin inflamación; 1, ligera/leve; 2, moderada; y 3, grave), según la distribución e intensidad de los siguientes hallazgos: 1) diseminación epitelial u ondulación de los núcleos de células epiteliales bronquiales, 2) aumento en el número de células calcificadas, 3) infiltración de células inflamatorias de los vasos en la zona mucosa y submucosa del bronquio e intersticio peribronquial y 4) hipertrofia y engrosamiento de la capa de células de músculo liso.

RT-PCR para el análisis de la expresión génica de citocinas y quimiocinas en el pulmón

15 Se extirpan los pulmones tras la perfusión con solución salina fisiológica, y se extrae ARN total usando ISOGEN (Nippon Gene) según las instrucciones del fabricante. Se transcribe de manera inversa el ARN total (10 μg) usando cebador de oligo(dT)15 (Promega) y transcriptasa inversa-ARNasa H Superscript II (Invitrogen Technologies) a 42°C durante 2 h. Para garantizar que cada muestra contenía la misma cantidad de ADNc, se determina en primer lugar la concentración de ADNc de β -actina de cada muestra usando cebadores específicos de β -actina. Se amplifican estas 20 muestras durante el número de ciclos apropiado, de manera que la cantidad de producto de PCR permaneciese en la parte lineal de la curva de amplificación. Se someten a electroforesis los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% y se visualizan mediante tinción con bromuro de etidio. Se determinan los niveles de IL-13, eotaxina, IL-10, IFN- γ y TGF- β usando los siguientes conjuntos de cebadores específicos.

El cebador sentido para β -actina 5'-ACGACATGGAGAAGATCTGG-3', y

25 el cebador antisentido 5'-TCGTAGATGGGCACAGTGTG-3'.

El cebador sentido para IL-13 5'-TCTTGCTTGCCTTGGTGGTCTCGC-3', y

el antisentido 5'-GATGGCATTGCAATTGGAGATGTTG-3'.

El cebador sentido para eotaxina 5'-GGCAGTAACTTCCATCTGTCTCC-3', y

el cebador antisentido 5'-CACTTCTTCTTGGGGTCAGC-3'.

30 El cebador sentido para IL-10 5'-TACCTGGTAGGAGTGATGCC-3', y

el antisentido 5'-GCATAGAAGCATAACATGATG-3'.

El cebador sentido para IFN- γ 5'-CATAGATGTGGAAGAAAAGA-3', y

el antisentido 5'-TTGCTGAAGAAGGTAGTAAT-3'.

El cebador sentido para TGF- β 5'-CTTTAGGAAGGACCTGGGTT-3', y

35 el antisentido 5'-CAGGAGCGACAATCATGTT-3'.

Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas

Un día tras la inhalación final (día 21), se preparan suspensiones de células individuales de bazo y ganglios linfáticos mediastínicos haciendo pasar las células a través de tamices celulares filtrantes de 70 μm (Becton/Dickinson Labware). Se eliminan los eritrocitos de las suspensiones de células de bazo mediante incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos. Se enriquecen células T $CD4^+$ y células T $CD4^+CD25^-$ usando un kit de aislamiento de células T $CD4^+$ (Miltenyi Biotec, Alemania) o un kit de aislamiento de células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).

Ensayos de proliferación de poblaciones de LN y esplenocitos a granel, se cultivan 2×10^5 células en placas con fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 μl de medio completo o bien solo o bien con OVA purificada, y 45 o bien con o bien sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF- β . Se añade OVA a concentraciones que oscilan entre 1 y 100 $\mu g/ml$. Se añaden los anticuerpos neutralizantes a 1, 0,1 y 0,01 $\mu g/ml$. Para los ensayos de proliferación de células T $CD4^+$ y poblaciones de células T $CD4^+CD25^-$, se cultivan 2×10^5 células T $CD4^+$ o células T $CD4^+CD25^-$ en placas con fondo en U de 96 pocillos con esplenocitos tratados con mitomicina que se cargan con OVA 1 mg/ml durante 16 h, que actúan como células presentadoras de antígeno, a razones de células T $CD4^+$ o células T $CD4^+CD25^-/APC$ de 1/1, 1/0,3, 1/0,1, 1/0,03, 1/0 en un volumen total de 50

200 µl de medio completo o bien con o bien sin anticuerpos neutralizantes. Tras 72 h a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂, se evalúa la proliferación mediante la adición de [³H]-timidina 1 µCi/pocillo. Se recoge la radiactividad unida al ADN 18 h más tarde sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y se mide la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

- 5 Para las mediciones de citocinas, se recogen los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación tras 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelan a -80°C hasta que se realiza el análisis de citocinas. Se cuantifica la producción de citocinas usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.).

Ensayo de actividad reguladora T in vivo

- 10 Un día tras la inhalación final (día 21), se digieren los bazo de los ratones tratados con colagenasa al 0,1% (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 20 min. En algunos experimentos, se preparan suspensiones de células individuales de células de bazo completas y se cultivan con Con A (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) durante 48 h. Se recogen las células, y se transfieren de manera adoptiva 10⁷ células por vía i.v. a ratones BALB/c sin tratamiento previo. Para la selección negativa, se reducen células CD4⁺, CD8⁺, CD11c⁺, CD19⁺ o CD11b⁺ de las células de bazo completas usando perlas magnéticas (MACS; Miltenyi Biotec) con AcM anti-CD4, CD8, CD11c, CD19 y CD11b de ratón biotinilado (BD Pharmingen), según las instrucciones del fabricante. Se examina la eficacia de la reducción mediante citometría de flujo (>99%). Se purifican células CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ usando un kit de aislamiento de células T CD4⁺ y un kit de aislamiento de células T reguladoras siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprueba la pureza de las células seleccionadas positivamente usando citometría de flujo. Para experimentos de transferencia de células, se transfieren células a ratones BALB/c de las venas de la cola justo antes de su primera inmunización o justo después de su segunda inmunización con OVA/alumbre. El número de células transferidas es de 10⁷ para células de bazo completas, células de bazo reducidas en una subpoblación o células CD4⁺CD25⁻ y células CD4⁺ seleccionadas positivamente.

En el modelo SCID humanizado (hu-SCID) (*tal como se describe por Duez et al., 2000; Hammad et al., 2000*)

- 25 En este modelo, puede estudiarse la respuesta inmunitaria alérgica al alérgeno de ácaros del polvo doméstico (HDM) Der p 1. Tales ratones hu-SCID reconstituidos por vía i.p. con PBMC de pacientes alérgicos a HDM y posteriormente expuestos a aerosoles de HDM producen IgE humana, desarrollan un infiltrado pulmonar compuesto por DC y células T activadas, y presentan AHR en respuesta a agentes broncoconstrictores (Pestel et al. 1994, J Immunol, 153:3804; Duez et al., Am J Respir Crit Care Med, vol. 161, págs. 200-206, 2000).

30 *Bacterias*

Se usa la cepa MG1363 de *L. lactis* a lo largo de todo este estudio. Se cultivan las bacterias en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con glucosa al 0,5%. Se almacenan las suspensiones madre de todas las cepas a -20°C en glicerol al 50% en GM17. Para inoculaciones intragástricas, se diluyen las suspensiones madre 200 veces en GM17 nuevo y se incuban a 30°C. Alcanzaron una densidad de saturación de 2 x 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en el plazo de 16 horas. Se recogen las bacterias mediante centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 µl de esta suspensión diariamente mediante catéter intragástrico.

- 35

Plásmidos

Der p 1, una glicoproteína globular de 222 residuos de aminoácido, es uno de los alérgenos principales de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt). Se sintetiza la secuencia de ADN con uso de codones de *L. lactis* óptimo que codifica para la proteína Der p 1, se amplifica y se fusiona con la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina en el sentido de 3' del promotor P1 de lactococos. Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portan ADNc de IL-10 murina, Der p 1, Der p 1 aa52-71 y Der p 1 aa117-133 se denominan LL-IL10, LL-Derp1, LL-Derp1aa52-71 y LL-Derp1aa117-133. LL-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1NX, sirve como control.

- 45

Cuantificación de Der p1

Se determina Der p 1 a partir de LL-Derp1 usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) específico de Der p 1 desarrollado en el laboratorio. También se evalúa la producción de las proteínas recombinantes mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

50 *Pacientes*

Se recoge sangre de donantes sensibles o no sensibles a ácaros del polvo doméstico. Los pacientes alérgicos presentan las características habituales de sensibilización a ácaros del polvo doméstico. Las pruebas cutáneas hacia alérgeno de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (Stallergènes, Fresnes, Francia) (diámetro ≥ 10 mm) son positivas, y todos los pacientes tienen anticuerpos de IgE específicos de suero. Las concentraciones de IgE totales son mayores de 150 UI/ml (150-1600 UI/ml). Se someten a prueba donantes sanos como controles negativos (los

- 55

niveles de IgE totales son inferiores a 150 UI/ml, y tienen pruebas cutáneas negativas hacia alérgenos comúnmente inhalados).

Preparación de células mononucleares de sangre periférica humana

- 5 Se obtiene plasma rico en plaquetas tras la centrifugación (120 x g, 15 minutos) y se desecha. Se diluyen entonces las células sanguíneas en RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, Escocia) (vol/vol) y se disponen en capas sobre un gradiente de Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Tras la centrifugación (400 x g, 30 minutos), se recogen las PBMC en la interfase y se lavan tres veces en medio RPMI estéril antes de la transferencia.

Ratones

- 10 Se mantienen ratones C.B.-17 SCID (6-8 semanas de edad) en aisladores con lechos esterilizados en una instalación de animales específica. Se comprueba regularmente la colonia SCID para determinar la ausencia de inmunoglobulinas de suero de ratón mediante ELISA.

Transferencia de células mononucleares de sangre periférica en ratones SCID: Ratones hu-SCID con PBMC

- 15 Los ratones SCID tienen entre 6 y 8 semanas de edad en el momento de la transferencia de células. Se reconstituyen los ratones mediante inyección intraperitoneal de 10×10^6 células mononucleares de pacientes alérgicos o donantes sanos en 400 μ l de RPMI mediante una aguja de calibre 23. En el mismo día, reciben por vía intraperitoneal 2 unidades de índice de reactividad [IR] de Dpt. Cuatro días tras la reconstitución celular, se exponen los ratones SCID a aerosoles de alérgenos diariamente que contienen 100 unidades de IR de Dpt (100 unidades de IR son equivalentes a aproximadamente 200 μ g de proteína contenida en el extracto de Dpt) durante 4 días sucesivos (día 0 a día 4). El grupo control no se expone a Dpt. Un día antes de la medición de la reactividad de las vías respiratorias (día 35 y día 60), se exponen los ratones hu-SCID a otro aerosol de 100 unidades de IR de disolución de Dpt.
- 20

Entorno experimental

- Los ratones reciben *L. lactis* modificada por ingeniería genética para expresar Der p 1 o un antígeno irrelevante (OVA) como control negativo, combinado o no con LL-IL10 o proteína de IL-10 (1 ó 10 μ g).
- 25 Se administran por vía oral bacterias *L. lactis* modificadas por ingeniería genética a ratones SCID usando un catéter gástrico, usando diferentes intervalos de tratamiento y dosis comenzando un día tras la reconstitución con PBMC. Se evalúa la inducción de tolerancia oral midiendo anticuerpos de IgE séricos humanos, análisis de infiltración pulmonar, medición de AHR y análisis de poblaciones de células y producción de citocinas en el BALF. Además, se evalúa la inducción de tolerancia mediante análisis de la respuesta de células T proliferativa contra Der p 1.

30 *Evaluación de la reactividad de las vías respiratorias (AHR)*

Se mide la reactividad de las vías respiratorias (expresada como dosis estimulante de carbacol que provoca un aumento del 50% en la resistencia de los pulmones) en el día 35 o el día 60 tal como se describe por Duez *et al.* 2000.

Mediciones de IgE humana

- 35 Varios días tras el trasplante con células humanas, se extrae sangre de los ratones del seno retroorbital bajo anestesia con éter. Se investiga la IgE humana total mediante un método inmunoradiométrico de dos sitios con el uso de dos AcM de ratón diferentes específicos para la cadena ϵ (Immunotech International, Luminy, Francia). Se usan al menos 20 μ l de suero en una prueba por duplicado. La sensibilidad del método permite la detección de 0,1 UI/ml (0,24 ng/ml).

- 40 Se cuantifica el Ac de IgE específico contra el alérgeno *Dpt* mediante ELISA. En resumen, se recubren durante la noche tubos de plástico (Maxisorb Startube, Nunc, Dinamarca) con alérgeno *Dpt* en tampón carbonato/bicarbonato 0,1 M (pH 9,6) a 4°C y se saturan con BSA al 1% en PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar, se incuban los tubos durante 2 h a temperatura ambiente y durante la noche a 4°C con suero de ratones Hu-SCID diluido en PBS que contiene BSA (al 1%) y Tween (al 0,01%). Tras lavados extensos, se añade un Ac anti-IgE humana marcado con HRP. Tras lavar, se añade el sustrato [reactivo de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), Pharmingen, Becton Dickinson, Erembodegem, Bélgica] a cada pocillo. Finalmente, se detienen las reacciones añadiendo H₂SO₄ 1 M a los pocillos. Se leen las absorbancias a 450 nm.
- 45

Examen histológico del pulmón.

- 50 Se extirpan los pulmones en el día 35 y se fijan en paraformaldehído y se procesan para su incrustación en parafina. Se tiñen las secciones de tejido en parafina para la detección de células CD45+ humanas, tras lo cual se cuantificaron las células humanas en las secciones de pulmón murino mediante puntuación histológica tal como se describe por Duez *et al.* 2000.

Análisis de fluido de lavado broncoalveolar (BALF)

Se analiza BALF tal como se describe en el modelo de alérgeno OVA.

Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas:

- 5 Se preparan suspensiones de células individuales de bazo haciendo pasar las células a través de tamices celulares filtrantes de 70 μm (Becton/Dickinson Labware). Se eliminan los eritrocitos de las suspensiones de células de bazo mediante incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos. Se enriquecen células T CD4^+ y células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ usando un kit de aislamiento de células T CD4^+ humanas (Miltenyi Biotec, Alemania) o un kit de aislamiento de células T reguladoras $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ humanas (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).
- 10 Ensayos de proliferación de esplenocitos a granel, se cultivan 2×10^5 células en placas con fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 μl de medio completo o bien solas o bien con Der p1 purificado, y o bien con o bien sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF- β . Se añade Der p1 a concentraciones que oscilan entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Se añaden los anticuerpos neutralizantes a 1, 0,1 y 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Para los ensayos de proliferación de células T CD4^+ humanas y poblaciones de células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ humanas, se cultivan 2×10^5
- 15 células T CD4^+ o células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ en placas con fondo en U de 96 pocillos con PBMC humanas tratadas con mitomicina que se cargan con Der p1 1 mg/ml durante 16 h, que actúan como células presentadoras de antígeno, a razones de células T CD4^+ o células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-/\text{APC}$ de 1/1, 1/0,3, 1/0,1, 1/0,03, 1/0 en un volumen total de 200 μl de medio completo o bien con o bien sin anticuerpos neutralizantes. Tras 72 h a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO_2 , se evalúa la proliferación mediante la adición de [^3H]-timidina 1 $\mu\text{Ci/pocillo}$. Se recoge la radiactividad unida al ADN 18 h más tarde sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y se mide la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Perkin Elmer).
- 20 Para las mediciones de citocinas, se recogen los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación tras 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelan a -80°C hasta que se realiza el análisis de citocinas. Se cuantifica la producción de citocinas usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.).
- 25 Ejemplo C1: LL-IL10 potencia significativamente la capacidad de inducción de tolerancia de LL-OVA y LL-Der p 1 en el modelo de OVA y de ratones huSCID para el asma, respectivamente.
- Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). La adición de LL-IL-10 potencia significativamente la inducción de tolerancia
- 30 hacia OVA/Derp1 ya que la respuesta proliferativa específica de alérgeno de los esplenocitos se reduce significativamente en el grupo de LL-OVA/Derp1+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-OVA/Derp1 y control.
- Ejemplo C2: LL-IL10 potencia la tolerancia oral en asociación con la reducción de AHR, infiltración eosinofílica, niveles de IgE séricos y disminución de la producción de citocinas IL-13, IL-4 e IL-5 en respuesta a dicho alérgeno.
- 35 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). Se determina AHR, infiltración de BALF eosinofílica, título de IgE así como producción de citocinas en respuesta a dicho factor tal como se describió anteriormente. AHR, infiltración de BALF eosinofílica, título de IgE se reducen fuertemente, e IL-13, IL-4 e IL-5 disminuyen significativamente en el grupo de LL-OVA/Derp1+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-OVA/Derp1 y control.
- 40 Ejemplo C3: LL-IL10 potencia la tolerancia oral mediante células T CD4^+ .
- Para evaluar si células T CD4^+ median la inducción de tolerancia oral, se estudia la respuesta de células T CD4^+ proliferativa específica de alérgeno en los esplenocitos y ganglios linfáticos. Por tanto, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*) y se determina la proliferación de células T CD4^+
- 45 específica de alérgeno tal como se describe en *Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas*. La respuesta de células T CD4^+ específica de alérgeno en el grupo de LL-OVA/Derp1+LL-mIL-10 se reduce significativamente en comparación con los grupos de LL-OVA/Derp1 y control.
- Ejemplo C4: IL-10 es menos eficaz que LL-IL10 en la potenciación de la tolerancia oral
- Para evaluar si LL-IL10 es tan eficaz como IL-10, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). Se estudia la respuesta de células T CD4^+ proliferativa específica de alérgeno
- 50 en los esplenocitos y ganglios linfáticos. La respuesta de células T CD4^+ específica de alérgeno en el grupo de LL-OVA/Derp1+LL-mIL-10 se reduce significativamente en comparación con el grupo de LL-OVA/Derp1 + IL-10.
- Ejemplo C5: Células reguladoras T inducidas por antígeno tras la terapia de combinación con LL-OVA - LL-IL10 pueden transferir protección frente a respuestas de tipo asma *in vivo*

Con el fin de someter a prueba la supresión activa de respuestas de tipo asma en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, se transfieren de manera adoptiva esplenocitos de los diferentes grupos tratados tal como se describió anteriormente (*Ensayo de actividad reguladora T in vivo*). En comparación con los controles y el grupo de LL-OVA, se reducen significativamente las respuestas de tipo asma en el grupo de LL-OVA + LL-mIL-10, indicando activación de células T CD4⁺ reguladoras en este protocolo de tolerancia oral de combinación.

Ejemplo D: Inducción de tolerancia a alfa-gliadina tras la administración oral de *L. lactis* que secreta dicho alérgeno en combinación con IL-10 administrada *in situ*

Introducción

La enfermedad celíaca, también conocida como esprúe celíaco o enteropatía sensible al gluten, es una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla a partir de una respuesta inmunitaria a granos de la dieta específicos que contienen gluten. La enfermedad celíaca es un trastorno multigénico complejo que está fuertemente asociado con los genes que codifican para las variantes antigénicas de leucocitos humanos HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Uno de los aspectos más importantes en la patogénesis de la enfermedad celíaca es la activación de una respuesta inmunitaria de tipo 1 auxiliar T. Esto surge cuando células presentadoras de antígeno que expresan moléculas de HLA-DQ2/DQ8 presentan los péptidos del gluten tóxicos a células T CD4(+). Ambas clases de proteínas del gluten, gliadinas y gluteninas, contienen péptidos que se unen a DQ2 y DQ8. Está generalmente aceptado que la respuesta inmunitaria, tal como la producción de IFN- γ a partir de células T específicas del gluten, desencadena la destrucción de la mucosa en el intestino delgado de pacientes con enfermedad celíaca. Por tanto, la activación de una respuesta de células T inmunitaria perjudicial en el intestino de pacientes con enfermedad celíaca parece ser la clave en el inicio y la progresión de la enfermedad.

En el presente documento, se demuestra que la administración oral de péptidos de gliadina en combinación con *L. lactis* que produce IL-10 suprime respuestas inmunitarias específicas de gliadina mediante la inducción de células T reguladoras CD4⁺ específicas de antígeno.

Materiales y métodos para los ejemplos

25 *Bacterias*

Se usa la cepa MG1363 de *L. lactis* a lo largo de todo este estudio. Se cultivan las bacterias en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con glucosa al 0,5%. Se almacenan las suspensiones madre de todas las cepas a -20°C en glicerol al 50% en GM17. Para inoculaciones intragástricas, se diluyen las suspensiones madre 200 veces en GM17 nuevo y se incuban a 30°C. Alcanzaron una densidad de saturación de 2 x 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en el plazo de 16 horas. Se recogen las bacterias mediante centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 μ l de esta suspensión diariamente mediante catéter intragástrico.

Plásmidos

Se sintetizan las secuencias de ADN con uso de codones de *L. lactis* óptimo que codifican para la proteína alfa-gliadina (basándose en la secuencia de *Triticum aestivum*, AJ133612), y los péptidos de gliadina HLA-DQ8 (correspondiente a los residuos 203-220, secuencia QYPSGQGSFQPSQQNPQA de UniProtKB/TrEMBL entrada Q9M4L6) y forma desamidada de HLA-DQ8 (correspondiente a los residuos 203-220, secuencia QYPSGEGSFQPSQENPQA de UniProtKB/TrEMBL entrada Q9M4L6), se amplifican y se fusionan a la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, en el sentido de 3' del promotor P1 de lactococos.

Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portan IL-10 murina, alfa-gliadina, HLA-DQ8 y HLA-DQ8 desamidada se denominan LL-IL10, LL-HLA/DQ8, LL-HLA/DQ8d. LL-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1 NX, sirve como control.

Cuantificación de HLA-DQ8 y DQ8d

Se determinan HLA-DQ8 y HLA-DQ8d a partir de LL-HLA/DQ8 y LL-HLA/DQ8d usando un ELISA desarrollado en el laboratorio. También se evalúa la producción de las proteínas recombinantes mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Ratones

Se mantienen los ratones transgénicos para HLA-DQ8 (Senger *et al.* 2003) en condiciones libres de patógenos específicos con una dieta libre de gluten y se usan a la edad de 8-14 semanas. Se inmunizan los ratones mediante inyecciones en las almohadillas de las patas con 50 μ g de gluten en bruto (Sigma-Aldrich) en 50 μ l de CFA (Difco; BD).

Inducción de tolerancia oral

Para experimentos de tolerización, se administran LL-HLA/DQ8, LL-HLA/DQ8d sola o combinada con IL-10 (1 ó 10

µg) o LL-IL10, LL-IL10 sola, IL-10 sola (1 ó 10 µg), LL-pT1NX o agua (control sin alimentación) antes y después de la inmunización usando diferentes intervalos de tratamiento y dosis. Como controles positivos para la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones con dosis de 50 mg de gliadina de trigo o alfa-gliadina recombinante, disuelta en agua a partir de la disolución madre, en los días -7, -6, -5, -4 antes de la inmunización (día 0).

5 *Medición de Ig específica de gliadina sérica*

Se resuspende gliadina en bruto (Sigma-Aldrich) en metanol a 10 mg/ml, y entonces se diluye en etanol absoluto a una concentración de 1 µg/ml. Se colocan cien microlitros de la disolución en etanol de gliadina 1 µg/ml en cada pocillo de una placa Immulon 2 (Fisher Scientific International Inc.) y entonces se deja secar en una campana de extracción. Entonces se bloquea la placa con BSA al 4%/PBS durante 2 horas a 37°C. Se lava la placa con 1 x PBS, Tween-20 al 0,05%. Se diluyen los sueros de las muestras en BSA al 0,1%/PBS 1:200, 1:400 y 1:800 y se incuban durante 1 hora a 37°C. Los anticuerpos de detección son anticuerpo de rata anti-IgA de ratón biotinilado de Accurate Chemical & Scientific Corp., y anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. El conjugado enzimático es estreptavidina-HRP, y el sustrato es TMB.

Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas:

15 Se preparan suspensiones de células individuales de bazo y ganglios linfáticos mediastínicos haciendo pasar las células a través de tamices celulares filtrantes de 70 µm (Becton/Dickinson Labware). Se eliminan los eritrocitos de las suspensiones de células de bazo mediante incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos. Se enriquecen células T CD4⁺ y células T CD4⁺CD25⁻ usando un kit de aislamiento de células T CD4⁺ (Miltenyi Biotec, Alemania) o un kit de aislamiento de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).

20 Ensayos de proliferación de poblaciones de LN y esplenocitos a granel, se cultivan 2x10⁵ células en placas con fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 µl de medio completo o bien solo o bien con gliadina en bruto o HLA-DQ8/DQ8d sintética, y o bien con o bien sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF-β. Se añaden los antígenos a concentraciones que oscilan entre 1 y 100 µg/ml. Se añaden los anticuerpos neutralizantes a 1, 0,1 y 0,01 µg/ml. Para los ensayos de proliferación de células T CD4⁺ y poblaciones de células T CD4⁺CD25⁻, se cultivan 2 x 10⁵ células T CD4⁺ o células T CD4⁺CD25⁻ en placas con fondo en U de 96 pocillos con esplenocitos tratados con mitomicina que se cargan con HLA-DQ8/DQ8d sintética o gliadina en bruto 1 mg/ml durante 16 h, que actúan como células presentadoras de antígeno, a razones de células T CD4⁺ o células T CD4⁺CD25⁻/APC de 1/1, 1/0,3, 1/0,1, 1/0,03, 1/0 en un volumen total de 200 µl de medio completo o bien con o bien sin anticuerpos neutralizantes. Tras 72 h a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂, se evalúa la proliferación mediante la adición de [³H]-timidina 1 µCi/pocillo. Se recoge la radiactividad unida al ADN 18 h más tarde sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y se mide la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

35 Para las mediciones de citocinas, se recogen los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación tras 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelan a -80°C hasta que se realiza el análisis de citocinas. Se cuantifica la producción de citocinas usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.).

Ejemplo D1: LL-IL10 potencia significativamente la capacidad de inducción de tolerancia de LL-HLA/DQ8d

40 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*Inducción de tolerancia oral*). La adición de LL-IL-10 potencia significativamente la inducción de tolerancia hacia HLA-DQ8d ya que la respuesta proliferativa específica de HLA-DQ8d de los esplenocitos se reduce significativamente en el grupo de LL-HLA/DQ8d+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-HLA/DQ8d y control.

45 Ejemplo D2: LL-IL10 potencia la tolerancia oral en asociación con la producción reducida de IFN-γ en respuesta a dicho alérgeno.

50 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*Inducción de tolerancia oral*). Se cuantifica la producción de citocinas en respuesta a HLA-DQ8d tal como se describió anteriormente (*Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas*). En esplenocitos y ganglios linfáticos, la producción de la citocina proinflamatoria IFN-γ se reduce fuertemente en el grupo de LL-HLA/DQ8d+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-HLA/DQ8d y control.

Ejemplo D3: LL-IL10 potencia la tolerancia oral mediante células T CD4+.

55 Para evaluar si células T CD4 median la inducción de tolerancia oral, se estudia la respuesta de células T CD4 proliferativa específica de DQ8 en los esplenocitos y ganglios linfáticos. Por tanto, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*Inducción de tolerancia oral*) y se determina la proliferación de células T CD4+ específica de DQ8 tal como se describe en *Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas*. La

respuesta de células T CD4 específica de DQ8 en el grupo de LL-HLA/DQ8d+LL-mIL-10 se reduce significativamente en comparación con los grupos de LL-HLA/DQ8d y control.

Ejemplo D4: IL-10 es menos eficaz que LL-IL10 en la potenciación de la tolerancia oral

- 5 Para evaluar si LL-IL10 es tan eficaz como IL-10, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*Inducción de tolerancia oral*). Se estudia la respuesta de células T CD4 proliferativa específica de DQ8 en los esplenocitos y ganglios linfáticos. La respuesta de células T CD4 específica de DQ8 en el grupo de LL-HLA/DQ8d+LL-mIL-10 se reduce significativamente en comparación con el grupo de LLHLA/DQ8d + IL-10.

Ejemplo E: Inducción de tolerancia al alérgeno alimentario BLG tras la administración oral de *L. lactis* que secreta dicho alérgeno en combinación con IL-10 administrada *in situ*

10 Introducción

La alergia alimentaria es una enfermedad que afecta a de aproximadamente el 2% al 5% de la población. En seres humanos, anticuerpos de IgE elevados así como la presencia de linfocitos T específicos de antígeno, que producen IL-4, sugiere un mecanismo desviado hacia Th2.

- 15 En el presente documento, se demuestra que la administración oral de un alérgeno alimentario en combinación con *L. lactis* que produce IL-10 suprime respuestas inmunitarias específicas de alérgeno mediante la inducción de células T reguladoras CD4⁺ específicas de antígeno.

Materiales y métodos para los ejemplos

Bacterias y plásmidos

- 20 Se usa la cepa MG1363 de *L. lactis* a lo largo de todo este estudio. Se cultivan las bacterias en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con glucosa al 0,5%. Se almacenan las suspensiones madre de todas las cepas a -20°C en glicerol al 50% en GM17. Para inoculaciones intragástricas, se diluyen las suspensiones madre 200 veces en GM17 nuevo y se incuban a 30°C. Alcanzan una densidad de saturación de 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en el plazo de 16 horas. Se recogen las bacterias mediante centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 μ l de esta suspensión diariamente mediante catéter intragástrico. Se amplifica ADNc de β -lactoglobulina bovina y se fusiona a la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, en el sentido de 3' del promotor P1 de lactococos.

Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portan IL-10 murina o BLG se denominan LL-IL10 y LL-BLG. LL-pT1 NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1 NX, sirve como control.

30 *Cuantificación de β -lactoglobulina bovina (BLG)*

Se determina BLG a partir de LL-BLG usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) específico de BLG desarrollado en el laboratorio y análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Entorno experimental

- 35 El modelo murino de alergia alimentaria usado para explorar el efecto protector de *L. lactis* es un modelo de ratón de respuesta de tipo IgE inducida por alimento tal como se describe por Frossard *et al.* (J Allergy Clin Immunol 113:958-964, 2004). Los ratones reciben LL-BLG o un antígeno irrelevante (OVA) como control negativo, combinado o no con LL-IL10 o IL-10 recombinante (1 ó 10 μ g). Como control positivo para la inducción de tolerancia, los ratones reciben una dosis alta de BLG en el agua potable que previene la anafilaxia en los ratones tras la exposición oral con BLG.

- 40 En un entorno profiláctico, se administran por vía oral a los ratones las bacterias *L. lactis* modificadas por ingeniería genética que producen BLG usando un catéter gástrico, usando diferentes intervalos de tratamiento y dosis. Posteriormente, se exponen por vía oral estos ratones receptores con antígeno BLG purificado, en presencia de toxina del cólera. Se exponen los animales control a *L. lactis* modificada por ingeniería genética con un vector control que no expresa BLG (sino OVA en su lugar). Se evalúa la inducción de tolerancia mediante análisis de la anafilaxia tras la exposición intragástrica con antígeno, midiendo los títulos de IgG1, IgG2a e IgE específicas de BLG en suero y heces, determinando el número de células que secretan anticuerpos en bazo y PP, mediante análisis de la proliferación de células T y la producción de citocinas en MLN, PP y bazo.

- 45 Para evaluar si la inducción de tolerancia inmunitaria hacia BLG podría potenciarse mediante IL-10, se administra a los ratones LL-BLG junto con LL-IL10.

Sensibilización oral a BLG.

- 50 Se inmunizan ratones C3H/HeOuj hembra de cuatro a 5 semanas de edad (Charles River) en los días 0, 7, 14 y 21 mediante sonda intragástrica con 20 mg de BLG (Sigma) y 10 μ g de CTX, adquiridos de List Biological Laboratories

en NaHCO₃ 0,2 mol/l. El grupo control positivo (ratones tolerizados) recibe BLG 0,8 mg/ml en su agua potable a voluntad durante 4 semanas. La cantidad total de proteína administrada (22,4 mg) es similar a la cantidad total de BLG administrada a los ratones sensibilizados. Para demostrar que el procedimiento de tolerización también activa de manera duradera el sistema inmunitario periférico y no sólo el mucoso, se inyecta a un grupo de ratones tolerizados dos veces 80 µg por vía i.p. de BLG adsorbido en 1 mg de alumbre en los días 28 y 42.

Exposición a antígeno

En el día 28, se exponen todos los ratones mediante sonda intragástrica con 100 mg de BLG en 0,4 ml de NaHCO₃ 0,2 mol. Se observa anafilaxia y se clasifica usando una puntuación de reacción (0, sin reacción, hasta 3, reacción grave o muerte) descrita en detalle en otra parte (Frossard *et al.*, 2001). Se mide la temperatura corporal central mediante infrarrojos en la oreja antes de la exposición y 30 minutos tras la sonda. Se sacrifican los animales, y se recoge sangre mediante punción cardiaca en tubos que contienen EDTA, y se obtiene plasma para la medición de histamina mediante un kit de ELISA comercial (Immunotech, Marseille, Francia).

Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas:

Se preparan suspensiones de células individuales de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y PP tal como se describe por Frossard *et al.* (2004). Se enriquecen células T CD4⁺ y células T CD4⁺CD25⁻ usando un kit de aislamiento de células T CD4⁺ (Miltenyi Biotec, Alemania) o un kit de aislamiento de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).

Ensayos de proliferación de poblaciones de LN y esplenocitos a granel, se cultivan 2x10⁵ células en placas con fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 µl de medio completo o bien solo o bien con BLG purificada, y o bien con o bien sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF-β. Se añade BLG a concentraciones que oscilan entre 1 y 100 µg/ml. Se añaden los anticuerpos neutralizantes a 1, 0,1 y 0,01 µg/ml. Para los ensayos de proliferación de células T CD4⁺ y poblaciones de células T CD4⁺CD25⁻, se cultivan 2 x 10⁵ células T CD4⁺ o células T CD4⁺CD25⁻ en placas con fondo en U de 96 pocillos con esplenocitos tratados con mitomicina que se cargan con BLG 1 mg/ml durante 16 h, que actúan como células presentadoras de antígeno, a razones de células T CD4⁺ o células T CD4⁺CD25⁻/APC de 1/1, 1/0,3, 1/0,1, 1/0,03, 1/0 en un volumen total de 200 µl de medio completo o bien con o bien sin anticuerpos neutralizantes. Tras 72 h a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂, se evalúa la proliferación mediante la adición de [³H]-timidina 1 µCi/pocillo. Se recoge la radiactividad unida al ADN 18 h más tarde sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y se mide la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

Para las mediciones de citocinas, se recogen los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación tras 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelan a -80°C hasta que se realiza el análisis de citocinas. Se cuantifica la producción de citocinas usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.).

Ensayo de actividad reguladora T in vivo

Con el fin de someter a prueba la supresión activa de la formación de anticuerpos en ratones, se transfieren de manera adoptiva esplenocitos, células T CD4⁺, células T CD4⁺CD25⁻ o CD4⁺CD25⁺ purificadas en perlas, aislados de los diferentes grupos experimentales tratados con *L. lactis* a ratones C3H/HeOuJ sin tratamiento previo. Se usan ratones no tratados como control. El número de células transferidas es de 10⁷ para células de bazo completas, células de bazo reducidas en una subpoblación o células T CD4⁺CD25⁻ y CD4⁺CD25⁺ y células CD4⁺ seleccionadas positivamente. Si están implicados Tregs, la exposición posterior de estos ratones con antígeno BLG debe prevenir la inducción de respuestas inmunitarias humorales contra BLG y la anafilaxia.

Inmunoensayos ligados a enzimas para anticuerpos de suero y heces específicos para BLG.

Se obtienen sueros de hemorragias en la cola en el día 0, 7, 14, 21 y 28. Se obtienen heces a los mismos tiempos y se resuspenden en PBS más FCS al 1% (Life technologies) complementado con pepstatina 1:1000 (Fluka) a 0,1 mg/ml. Se disgregan las muestras mecánicamente y se agitan con vórtex durante 2 minutos, seguido por dos centrifugaciones a 4°C durante 20 minutos a 14.000 rpm.

Se someten a ensayo los sueros y las heces para determinar los niveles de IgE, IgG1, IgG2a y/o IgA específicos de BLG mediante un método adaptado de Adel-Patient *et al.* (2000, J. Immunol Methods). En resumen, se recubren placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc) durante 18 horas a temperatura ambiente con 250 ng/pocillo de estreptavidina (Fluka), seguido por 300 µl de una disolución de polivinilpirrolidona K25 (Fluka) durante la noche. Se incuba un microgramo de BLG biotinilada durante 3 horas, y se añaden sueros (1:6666 y 1:2222 para IgG1, 1:666 y 1:222 para IgG2a, 1:66 y 1:22 para IgE) o heces (1:3, 1:10, y 1:33) diluidos en PBS más suero de caballo al 10% por duplicado en presencia de anticuerpos de cabra anti-IgA de ratón, de rata anti-IgG1 de ratón o anti-IgG2a de ratón 0,5 µg/ml marcados con peroxidasa (Southern Biotechnologies) durante 2 horas. Para la medición de IgE, se añade un Ac de rata monoclonal anti-IgE de ratón (clon R35-72, BD Pharmingen) seguido por Ac anti-rata acoplado a peroxidasa (Caltag). Se mide la densidad óptica a 490 nm. Se expresan los resultados como unidades arbitrarias,

usándose sueros agrupados de ratones inmunizados con BLG más alumbre como suero de referencia.

Producción de anticuerpos específicos de antígeno medida por medio de ELISPOT.

5 Se extirpan mecánicamente placas de Peyer del intestino y se incuban durante 30 minutos en medio HBSS complementado con EDTA 5 mmol (Life Technologies). De manera similar, se trituran suavemente placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos y se filtran a través de un filtro de nailon de 70 μm . Se incuban previamente células de bazo durante 5 minutos en NH_4Cl tamponado con Tris para eliminar los glóbulos rojos. Se aíslan linfoblastos en un gradiente del 60%/66% de Percoll (Amersham).

10 Para la medición de anticuerpos de IgG1, IgG2a e IgA específicos de BLG, se recubren placas de ELISPOT (Millipore) con estreptavidina durante la noche a 37°C, seguido por la adición de 1 μg de BLG biotinilada durante 3 horas. Se aíslan linfoblastos en un gradiente del 60%/66% de Percoll y se resuspenden a dos concentraciones diferentes, 1 y 2×10^6 en medio de Dulbecco modificado por Iscove complementado con penicilina, estreptomycin, L-glutamina, gentamicina, polimixina B y FCS al 5% durante 24 horas a 37°C, seguido por incubación durante la noche a 4°C con anticuerpos anti-IgA, anti-IgG1 y anti-IgG2a (Southern Biotechnology). Se añade amino-etil-carbazol, 100 μl /pocillo, durante 10 minutos, y se cuentan automáticamente los puntos usando el software KS ELISPOT 4.2.1 (Zeiss) y se expresan como unidades formadoras de células por 10^6 células (UFC).

15 Ejemplo E1: LL-IL10 potencia significativamente la capacidad de inducción de tolerancia de LL-BLG en el modelo murino de alergia alimentaria.

20 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). La adición de LL-IL-10 potencia significativamente la inducción de tolerancia hacia BLG ya que la respuesta proliferativa específica de alérgeno de los esplenocitos se reduce significativamente en el grupo de LL-BLG+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-BLG y control.

Ejemplo E2: LL-IL10 potencia la tolerancia oral en asociación con la reducción de la respuesta de anticuerpos específicos de BLG y la disminución de la producción de citocina IL-4 en respuesta a dicho alérgeno.

25 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). Se determina la respuesta de anticuerpos específicos de BLG y la producción de citocinas en respuesta a dicho factor tal como se describió anteriormente. Los niveles de anticuerpos específicos de BLG e IL-4 disminuyen significativamente en el grupo de LL-BLG+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-BLG y control.

Ejemplo E3: LL-IL10 potencia la tolerancia oral mediante células T CD4+.

30 Para evaluar si células T CD4 median la inducción de tolerancia oral, se estudia la respuesta de células T CD4 proliferativa específica de alérgeno en los esplenocitos y ganglios linfáticos. Por tanto, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*) y se determina la proliferación de células T CD4+ específica de alérgeno tal como se describe en *Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas*. La respuesta de células T CD4 específica de alérgeno en el grupo de LL-BLG+LL-mIL-10 se reduce significativamente en comparación con los grupos de LL-BLG y control.

Ejemplo E4: IL-10 es menos eficaz que LL-IL10 en la potenciación de la tolerancia oral

40 Para evaluar si LL-IL10 es tan eficaz como IL-10, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). Se estudia la respuesta de células T CD4 proliferativa específica de alérgeno en los esplenocitos y ganglios linfáticos. La respuesta de células T CD4 específica de alérgeno en el grupo de LL-BLG+LL-mIL-10 se reduce significativamente en comparación con el grupo de LLBLG + IL-10.

Ejemplo E5: Células reguladoras T inducidas por antígeno tras la terapia de combinación con LL-BLG - LL-IL10 pueden transferir protección frente a respuestas de tipo alérgico *in vivo*

45 Con el fin de someter a prueba la supresión activa de respuestas de tipo alérgico en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, se transfieren de manera adoptiva esplenocitos de los diferentes grupos tratados tal como se describió anteriormente (*Ensayo de actividad reguladora T in vivo*). En comparación con los controles y los grupos de LL-BLG, las respuestas de tipo alérgico se reducen significativamente en el grupo de LL-BLG + LL-mIL-10, indicando activación de células T CD4⁺ reguladoras en este protocolo de tolerancia oral de combinación.

Ejemplo F: Inducción de tolerancia a insulina tras la administración oral de *L. lactis* que secreta dicho alérgeno en combinación con IL-10 administrada *in situ*

50 Introducción

La autoinmunidad se caracteriza por daño tisular inflamatorio espontáneo y por función fisiológica alterada que resultan de la pérdida de tolerancia a un antígeno propio. Está asociada con un sistema inmunitario parcialmente hiperactivo, que se caracteriza por un exceso de células auxiliares T (Th). Es difícil influir en los factores

5 predisponentes, tales como genes de susceptibilidad y factores ambientales, por tanto los esfuerzos recientes de desarrollar inmunoterapias se centran en el restablecimiento del equilibrio funcional entre células efectoras patógenas y células T inmunorreguladoras reduciendo las primeras y/o potenciando las últimas. La destrucción autoinmunitaria de células beta de islotes pancreáticos es la causa principal de diabetes mellitus tipo 1 (T1D). Esta destrucción está asociada con respuestas inmunitarias celulares y humorales a varios autoantígenos de células beta, ambas de las cuales pueden preceder a la aparición clínica de la enfermedad.

En el presente documento, se demuestra que la administración oral de un autoantígeno en combinación con *L. lactis* que produce IL-10 suprime respuestas inmunitarias específicas de diabetes mediante la inducción de células T reguladoras CD4⁺ específicas de antígeno.

10 Materiales y métodos para los ejemplos

Bacterias y plásmidos

15 Se usa la cepa MG1363 de *L. lactis* a lo largo de todo este estudio. Se cultivan las bacterias en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con glucosa al 0,5%. Se almacenan las suspensiones madre de todas las cepas a -20°C en glicerol al 50% en GM17. Para inoculaciones intragástricas, se diluyen las suspensiones madre 200 veces en GM17 nuevo y se incuban a 30°C. Alcanzan una densidad de saturación de 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en el plazo de 16 horas. Se recogen las bacterias mediante centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 μ l de esta suspensión diariamente mediante catéter intragástrico. Se sintetizan las secuencias de ADN con uso de codones de *L. lactis* óptimo que codifican para péptido B24-C36 de proinsulina II humana (hplp), insulina porcina y péptido 20 inmunodominante InsB₉₋₂₃ (B₉₋₂₃ es esencialmente el mismo a lo largo de muchas especies, ser humano, rata y ratón), se amplifican y se fusionan a la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, en el sentido de 3' del promotor P1 de lactococos.

25 Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portan IL-10 murina, hplp, insulina, InsB₉₋₂₃ se denominan LLIL10, LL-hplp, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃. LL-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1NX, sirvió como control. Se determina la expresión de estas proteínas usando ELISA específico de antígeno y análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Ratones

30 Se adquieren ratones diabéticos macho y hembra no obesos (NOD) y ratones NOD con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (antecedentes Balb/c) del Jackson laboratory. Se adquieren ratones Balb/c de tipo natural (WT) de Charles River Italia. Se mantienen los ratones en una instalación de animales central libre de patógenos específicos. Se tratan los ratones y se usan según las directrices institucionales.

Entorno experimental

35 En un *entorno profiláctico*, se administran por vía oral la LL-hplp, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃ a ratones NOD comenzando desde el día 21 de edad (destete), solas o junto con LL-IL10 o IL-10 de ratón recombinante (1-10 μ g), y usando el régimen de alimentación óptimo o hasta los 100 días de edad (cuando la mayoría de los ratones desarrollan diabetes). Además, se administra por vía oral LL-pT1NX como control negativo. Para el grupo control positivo (tolerizante), se tratan por vía oral ratones NOD de 3 semanas de edad con 0,8 mg de insulina humana 3 veces a la semana durante 2 ó 4 semanas. Se determina el desarrollo de diabetes mediante monitorización continua de los niveles de glucosa en orina tres veces a la semana y en el caso de glucosuria monitorizando los niveles de glucosa en sangre. Se recogen pancreasas a las 12-23 semanas y al final del experimento (35 semanas), y se tiñen secciones en serie con hematoxilina/eosina para puntuar la infiltración de células mononucleares o mediante inmunohistoquímica para analizar la infiltración de células T.

45 En un *entorno terapéutico*, se administran por vía oral la LL-hplp, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃, solas o junto con LL-IL10 o IL-10 de ratón recombinante, a hembras NOD diabéticas que muestran hiperglucemia y glucosuria estables (12-23 semanas). Además, se administra por vía oral LL-pT1 NX como control negativo. Para el grupo control positivo (tolerizante), se tratan ratones NOD diabéticos tal como se describe en Bresson *et al.* 2006. Se define la remisión completa como la desaparición de la glucosuria y el regreso a una glucemia normal.

Los mecanismos precisos de inducción de tolerancia se analizan *in vitro*, *in vivo* tras reexponer los ratones NOD con autoantígenos específicos y mediante transferencia adoptiva de células T a ratones NOD-SCID.

50 *Detección de diabetes:*

Monitorización de la glucosa: se mide la glucosa en orina usando Diastix (Miles) y se confirma mediante mediciones de la glucosa en sangre con el sistema de monitorización de la glucosa en sangre OneTouch Ultra (LifeScan Inc.). Se define la diabetes como 2 valores de glucosa en sangre consecutivos superiores a 250 mg/dl.

Insulinitis: Se sacrifican los ratones mediante asfixia con CO₂ y se fija el páncreas en formalina al 10% durante la

noche, se incrusta en parafina y se tiñen secciones de 5 µm en serie con hematoxilina y eosina. Se determina la puntuación de insulinitis (media ± DE) clasificando microscópicamente el grado de infiltración celular en 10-15 islotes/ratón tal como sigue: 0, sin signos visibles de infiltración de islotes; 1, infiltración peri-islotes; 2, < 50% de infiltración; 3, > 50% de infiltración.

5 *Inmunohistoquímica*

Para detectar la expresión de insulina, CD4 y CD8 en células β pancreáticas, se aplican Ac primarios (anticuerpo de cobaya anti-insulina porcina de Dako [dilución 1:300], RM4.5 anti-CD4 e IHC anti-CD8a de BD Biosciences [dilución 1:50] a secciones tisulares congeladas tal como se describe en Christen *et al.*, 2004.

Ensayo de proliferación in vitro

10 Se preparan suspensiones de células individuales de bazo, LN mesentéricos (MLN) y PLN. Ensayos de proliferación de poblaciones de esplenocitos totales, se cultivan 2x10⁵ células en placas con fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 µl de medio completo o bien solas o bien con concentraciones graduadas (1-100 µg/ml) de insulina humana purificada o péptidos específicos para células T CD4 (InsB₉₋₂₃, restringido por H-2^d o ^g) o para células T CD8 (InsB₁₅₋₂₃, restringido por K^d) (Sigma), y o bien con o bien sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF-β. Se añaden los anticuerpos neutralizantes a 1, 0,1 y 0,01 µg/ml. Para los ensayos de proliferación de células T CD3⁺, células T CD8⁺, células T CD4⁺ y poblaciones de células T CD4⁺CD25⁻ totales, se cultivan 0,2 x 10⁵ células T en placas con fondo en U de 96 pocillos con 1x10⁵ esplenocitos irradiados a partir de ratones Balb/c WT cargados con insulina o GAD65 o péptidos específicos para células T CD4⁺ o CD8⁺, en un volumen total de 200 µl de medio completo o bien con o bien sin anticuerpos neutralizantes. Tras 72 h a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂, se evalúa la proliferación mediante la adición de [³H]-timidina 1 µCi/pocillo. Se recoge la radiactividad unida al ADN 16-18 h más tarde sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y se mide la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Perkin Elmer). Se purifican células T a partir de PLN o bazos mediante selección negativa a través de separación con perlas magnéticas usando un kit de aislamiento de CD3⁺, CD4⁺ o CD8⁺ (MACS; Milteny Biotec, Auburn, CA). Se usan células T CD4⁺ como células totales o se separan adicionalmente en CD25⁺ y CD25⁻ mediante MACS usando un kit de aislamiento de CD25⁺ (Milteny Biotec). Se determina la pureza (> 90%) de las poblaciones de células mediante análisis por citometría de flujo.

30 Para las mediciones de citocinas, se recogen los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación (estimulación específica de antígeno), descritos anteriormente, tras 72 h de cultivo y se congelan a -80°C hasta que se realiza el análisis de citocinas. Se cuantifica la producción de citocinas usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.). Se cultivan células T CD3⁺, células T CD4⁺ o células T CD8⁺ purificadas y se estimulan *in vitro* de manera no específica con una mezcla de anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/ml cada uno) durante 24 horas o permanecen sin estimular como control. Se recogen los sobrenadantes, y se analizan para determinar la producción de IL-10, IL-4, IL-5 e IFN_γ usando el conjunto de matriz de perlas citométricas BD™ flex en un bioanalizador BD FACSArray usando el software FCAP array (BD Biosciences). Se usan experimentos de ELISA de captura para determinar TGF-β1 usando el kit Quantikine (R&D Systems).

35 *Ensayo de inhibición de la proliferación de células T in vitro*

40 Se cocultivan 2x10⁴ células T CD4⁺CD25⁻ esplénicas totales purificadas, aisladas de ratones NOD hembra recientemente diabéticos (8-12 semanas) con números variables de células T CD8⁺, células T CD4⁺ y poblaciones de células T CD4⁺CD25⁻ aisladas del bazo, MLN o PLN de los diferentes grupos experimentales en presencia de 2 x 10⁴ esplenocitos cargados con péptidos o insulina irradiados reducidos en células T de ratones Balb/c WT. Tras 72 h a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO₂, se evalúa la proliferación mediante la adición de [³H]-timidina 1 µCi/pocillo. Se recoge la radiactividad unida al ADN 16-18 h más tarde sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y se mide la incorporación de timidina en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

45 *Ensayo de citotoxicidad in vitro*

50 Las dianas de linfoblastos usadas son esplenocitos activados con Con A de ratones BALB/c. Se marcan un total de 10⁶ células diana con 100 µCi de ⁵¹Cr (Amersham International, Buckinghamshire, R.U.) durante 90 min. a 37°C, se lavan tres veces y se incuban entonces con péptido 1 µg/ml (InsB₁₅₋₂₃ o un péptido irrelevante) a 37°C durante 1 h. Se lavan las células diana dos veces y se siembran a 10⁴ células por pocillo. Se añaden a cada pocillo células T CD8⁺, aisladas de bazo, MLN y PLN, por triplicado, a diversas razones de efector:diana (E:D). Se centrifugan las placas a 500 rpm durante 2 min., y se incuban a 37°C durante 4 h. Tras la incubación, se recogen los sobrenadantes para la determinación de la liberación de ⁵¹Cr [% de lisis = 100 x (cpm de prueba – cpm espontáneas)/(cpm totales – cpm espontáneas)]. Para el ensayo de destrucción indirecta, se incuban células T CD8⁺ con anticuerpo anti-CD3 5 µg/ml (clon 145-2C11, Pharmingen) antes de la incubación con efectores.

55 *Transferencia adoptiva de diabetes*

5 Se inyectan a ratones NOD-SCID a las 8-10 semanas por vía i.v. 2×10^7 o por vía i.p. 5×10^6 esplenocitos aislados de ratones NOD hembra diabéticos (6 semanas, 12 semanas y 18 semanas) combinados con o sin números graduados de células T CD3⁺, células T CD8⁺, células T CD4⁺, células T CD4⁺CD25⁻ o CD4⁺CD25⁺ purificadas en perlas aisladas de los diferentes grupos experimentales tratados con *L. lactis*. Se usan ratones no tratados como control. Se determina el desarrollo de diabetes mediante monitorización continua de los niveles de glucosa en sangre tres veces a la semana.

Ejemplo F1: LL-IL10 potencia significativamente la capacidad de inducción de tolerancia de LL-hpIIP, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃ en el ratón diabético no obeso.

10 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). La adición de LL-IL10 potencia significativamente la inducción de tolerancia hacia el autoantígeno ya que la respuesta proliferativa específica de autoantígeno se reduce significativamente en el grupo de LL-hpIIP/insulina/InsB₉₋₂₃+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-hpIIP/insulina/InsB₉₋₂₃ y control.

Ejemplo F2: LL-IL10 potencia la tolerancia oral en asociación con la reducción de insulinitis, disminución de la tasa de destrucción de células beta y aumento de la producción de IL-10 por esplenocitos.

15 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). Se determinan la presencia de insulinitis, la tasa de destrucción de células beta y la producción de citocinas en respuesta a dicho autoantígeno tal como se describió anteriormente. El análisis histológico muestra un grado inferior significativo de insulinitis y destrucción de células beta y aumento de la producción de IL-10 en el grupo de LL-hpIIP/insulina/InsB₉₋₂₃+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-hpIIP/insulina/InsB₉₋₂₃ y control.

Ejemplo F3: LL-IL10 potencia la tolerancia oral mediante células T CD4⁺.

25 Para evaluar si células T CD4 median la inducción de tolerancia oral, se estudia la respuesta de células T CD4 proliferativa específica de autoantígeno en los esplenocitos y ganglios linfáticos. Por tanto, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*) y se determina la proliferación de células T CD4⁺ específica de autoantígeno tal como se describe (*ensayo de proliferación in vitro*). La respuesta de células T CD4 específica de autoantígeno en el grupo de LL-hpIIP/insulina/InsB₉₋₂₃+LL-mIL-10 en comparación con los grupos de LL-hpIIP/insulina/InsB₉₋₂₃ y control.

Ejemplo F4: IL-10 es menos eficaz que LL-IL10 en la potenciación de la tolerancia oral

30 Para evaluar si LL-IL10 es tan eficaz como IL-10, se alimentan los ratones por vía oral tal como se describió anteriormente (*entorno experimental*). Se estudia la respuesta de células T CD4 proliferativa específica de autoantígeno en los esplenocitos y ganglios linfáticos. La respuesta de células T CD4 específica de autoantígeno en el grupo de LL-hpIIP/insulina/InsB₉₋₂₃+LL-mIL-10 en comparación con el grupo de LL-hpIIP/insulina/InsB₉₋₂₃ + IL-10.

Ejemplo F5: Las respuestas de CD8⁺ autoagresivas se suprimen en ratones NOD tras la terapia de combinación con LL-InsB₁₅₋₂₃LL-IL10

35 Para examinar si este enfoque de combinación induce células T CD4⁺ supresoras que pueden modular la diabetes mediante mecanismos supresores circunstanciales, se analiza el efecto sobre células T autoagresivas CD8⁺. El porcentaje y/o la actividad de células CD8⁺ autoagresivas específicas de antígeno se reduce fuertemente tras la terapia de combinación.

40 Ejemplo F6: Células reguladoras T inducidas por antígeno tras la terapia de combinación con LL-InsB₁₅₋₂₃-LL-IL10 pueden transferir protección frente a respuestas de tipo alérgico *in vivo*

45 Con el fin de someter a prueba la supresión activa de respuestas de tipo diabético en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, se transfieren de manera adoptiva esplenocitos de los diferentes grupos tratados tal como se describió anteriormente (*transferencia adoptiva de diabetes*). En comparación con los controles y el grupo de LL-InsB₉₋₂₃, se reducen significativamente las respuestas de tipo diabético en el grupo de LL-InsB₉₋₂₃+LLmIL-10, indicando activación de células T CD4⁺ reguladoras en este protocolo de tolerancia oral de combinación.

Bibliografía

- Bi, L., Lawler, A.M., Antonarakis, S.E., High, K.A., Gearhart, J.D. y Kazazian, H.H. Jr. (1995) Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat. Genet.* 10, 119-121.
- 50 - Chuah, M.K., Schiedner, G., Thorrez, L., Brown, B., Johnston, M., Gillijns, V., Hertel, S., Van Rooijen, N., Lillicrap, D., Collen, D., VandenDriessche, T. y Kochanek, S. (2003) Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia A following gene therapy with high capacity adenoviral vectors. *Blood*, 101, 1734-1743.
- Daniel, C., Repa, A., Wild, C., Pollak, A., Pot, B., Breiteneder, H., Wiedermann, U. y Mercenier, A. (2006)

- Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v1. *Allergy*, 61, 812-819.
- De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O. y Moser, M. (1997) Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol.*, 27, 1229-35.
 - 5 - Di Giacinto, C., Marinaro, M., Sanchez, M., Strober, W. y Boirivant, M. (2005). Probiotics ameliorate recurrent Th-1 mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF- β -bearing regulatory cells. *J. Immunol.* 174, 3237-3246.
 - Duez, C., Kips, J., Pestel, J., Tournoy, K., Tonnel, A.B., y Pauwels, R. (2000) House dust mite-induced airway changes in hu-SCID mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 200-206.
 - 10 - Friedman A. y Weiner, H.L. (1994). Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 91, 6688-6692.
 - Frossard, C.P., Hauser, C. y Eigenmann, P.A. (2001) Oral carrageenan induces antigen-dependent oral tolerance: prevention of anaphylaxis and induction of lymphocyte anergy in a murine model of food allergy. *Pediatr. Res.* 49, 417-422.
 - 15 - Gaboriau-Routhiau, V., Raibaud, P., Dubuquoy, C. y Moreau, MC. (2003) Colonization of gnotobiotic mice with human gut microflora at birth protects against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin mediated abrogation of oral tolerance. *Pediatric Res.* 54, 739-746.
 - Hammad, H., Lambrecht, B.N., Pochard, P., Gosset, P., Marquillies, P., Tonnel, A.B. y Pestel, J. (2002) Monocyte derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7. *J. Immunol.* 169, 1524-1534.
 - 20 - Kasper, C.K. y Pool, J.G. (1975) Measurement of mild factor VIII inhibitors in Bethesda units. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34, 875-876.
 - Liu, X, Lagenauer, L.A., Simpson, D.A., Essenmacher, K.P., Frazier-Parker, C.L., Liu, Y., Tsai, D., Rao, S.S., Hamer, D.H., Parks, T.P., Lee, P.P. y Xu, Q. (2006) Engineered vaginal *Lactobacillus* strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor Cyanovirin-N. *A.A.C.* 50, 3250-3259.
 - 25 - Maassen, C.B., Laman, J.D., van Holten-Neelen, C., Hoogteijling, L., Groenewegen, L., Visser, L., Schellekens, M.M., Boersma, W.J. y Claassen, E. (2003) Reduced experimental autoimmune encephalomyelitis after intranasal and oral administration of recombinant lactobacilli expressing myelin antigens. *Vaccine*, 21, 4685-4693.
 - Mauer, M., Seidel-Guyenet, W., Metz, M., Knop, J. y Steinbrink, K. (2003). Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contract allergens. *J. Clin. Invest.* 112, 432-439.
 - 30 - Mayer, L. y Shao, L. (2004a). The use of oral tolerance in the therapy of chronic inflammatory/autoimmune diseases. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39, S746-S747.
 - Mayer, L. y Shao, L. (2004b). Therapeutic potential of oral tolerance. *Nature Rev. Immunol.* 4, 407-419.
 - Mingozzi, F., Liu, Y.L., Dobrzynski, E., Kaufhold, A., Liu, J.H., Wang, Y., Aeeuda, V.R., High, K.A. y Herzog, R.W. (2003) Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J. Clin. Invest.* 111, 1347-1356.
 - 35 - Moreau, M.C. y Corthier, G. (1988). Effect of the gastrointestinal microflora on the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* 56, 2766-2768.
 - Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J. y Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.* 115, 1923-1933.
 - 40 - Rask, C., Evertson, S., Telemo, E. y Wold, A.E. (2005). A full flora, but not monocolonization by *Escherichia coli* or *Lactobacilli* supports tolerogenic processing of a fed antigen. *Scan. J. Immunol.* 61, 529-535.
 - Schotte, L., Steidler, L., Vandekerckhove, J. y Remaut, E. (2000). Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 761-765.
 - 45 - Senger, S., Luongo, D., Maurano, F., Mazzeo, M.F., Siciliano, R.A., Gianfrani, C., David, C., Troncone, R., Auricchio, S. y Rossi, M. (2003) Intranasal administration of a recombinant alpha-gliadin down regulates the immune response to wheat gliadin in DQ8 transgenic mice. *Immunol. Lett.* 88, 127-134.
 - Slavin, A.J., Maron, R y Weiner, H.L. (2001). Mucosal administration of IL-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes. *Internat. Immunol* 13, 825-833.

- Steidler, L. y Rottiers, P. (2006) Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Ann N Y Acad. Sci.* 1072, 176-186.
- 5 - Strobel, S., Mowat, A.M., Drummond, H.E., Pickering, M.G. y Ferguson, A. (1983) Immunological responses to fed protein antigens in mice. II oral tolerance for CMI is due to activation of cyclophosphamide-sensitive cells by gut-processed antigen. *Immunology*, 49, 451-456.
- VandenDriessche, T., Vanslembrouck, V., Goovaerts, I., Zwinnen, H., Venderhaeghen, M.L., Collen, D. y Chuah, M.K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10379-10384.
- 10 - Villard, S., Lacroix-Desmazes, S., Kieber-Emmons, T., Piquer, D., Grailly, S., Benhida, A., Kaveri, S.V., Saint-Remy, J.M. y Granier, C. (2003) Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of human anti-FVIII inhibitor. *Blood*, 102, 949-952.
- Viney, J.L., Mowat, A.M., O'Malley, J.M., Williamson, E. y Fanger, N.A. (1998). Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J. Immunol.* 160, 5815-5825.
- Wang, L., Zoppe, M., Hackeng, T.M., Griffin, J.H., Lee, K.F., Verma, I.M. (1997) A factor IX deficient mouse model for hemophilia B therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11563-11566.
- 15 - Williamson, E., Bilsborough, J.M. y Viney, J.L. (2002). Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF-kappa B (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance. *J. Immunol.* 169, 3606-3612.

Lista de secuencias

- <110> ACTOGENIX N.V.
- 20 <120> INDUCCIÓN DE TOLERANCIA MUCOSA A ANTÍGENOS
- <130> AGX-011-EP-DIV1
- 25 <150> Documento EP 05111467.6
<151> 29-11-2005
- <160> 16
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
- 35 <220>
<223> Cebador directo 1
- 40 <400> 1
ggctccatcg gtcgagcaag catggaatt 29
- <210> 2
<211> 37
<212> ADN
45 <213> Artificial
- <220>
<223> Cebador inverso 1
- 50 <400> 2
actagttaag gggaaacaca tctgccaag aagagaa 37
- <210> 3
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Artificial
- <220>
<223> Cebador sentido de beta-actina

<400> 3
 acgacatgga gaagatctgg 20

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador antisentido de beta-actina

<400> 4
 tcgtagatgg gcacagtgtg 20

15 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador sentido de IL-13

<400> 5
 tcttgcttgc cttggtggtc tcgc 24

25 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador antisentido de IL-13

<400> 6
 gatggcattg caattggaga tgttg 25

35 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador sentido de eotaxina

<400> 7
 gggcagtaac ttccatctgt ctcc 24

45 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Cebador antisentido de eotaxina

<400> 8
 cacttcttct tgggtcagc 20

55 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Cebador sentido de IL-10

	<400> 9 tacctgtag gagtgatgcc	20
5	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador antisentido de IL-10	
15	<400> 10 gcatagaagc atacatgatg	20
20	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador sentido de IFN-gamma	
30	<400> 11 catagatgtg gaagaaaaga	20
35	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador antisentido de IFN-gamma	
45	<400> 12 ttgctgaaga aggtagtaat	20
50	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador sentido de TGF-beta	
60	<400> 13 cttaggaag gacctgggtt	20
65	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Cebador antisentido de TGF-beta	
75	<400> 14 caggagcgca caatcatgtt	20
80	<210> 15 <211> 18 <212> PRT <213> <i>Triticum aestivum</i>	
85	<400> 15	

Gln Tyr Pro Ser Gly Gln Gly Ser Phe Gln Pro Ser Gln Gln Asn Pro
1 5 10 15

Gln Ala

<210> 16

<211> 18

5 <212> PRT

<213> *Triticum aestivum*

<400> 16

Gln Tyr Pro Ser Gly Glu Gly Ser Phe Gln Pro Ser Gln Glu Asn Pro
1 5 10 15

10 Gln Ala

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos para su uso en el tratamiento de diabetes tipo I en un mamífero.
- 5 2. Microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos para su uso según la reivindicación 1, como alimento médico o nutraceutico.
3. Microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos para su uso según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además un anticuerpo anti-CD3.
4. Microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho antígeno es insulina.
- 10 5. Microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho antígeno se administra mediante un microorganismo secretor de antígeno.
6. Microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho microorganismo es *Lactococcus lactis*.
- 15 7. Microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo anti-CD3, dicho microorganismo secretor de IL-10, dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de antígeno se administra durante al menos 1 día, preferiblemente durante al menos 1 semana, más preferiblemente durante al menos 1 mes o 1 año.
- 20 8. Microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que dicho medicamento, alimento médico o nutraceutico es para administración mucosa.
9. Microorganismo secretor de IL-10 en combinación con un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho mamífero se elige del grupo que consiste en ratón, rata, perro, gato, ganado, caballo, cerdo y ser humano.
- 25 10. Composición que comprende un microorganismo secretor de IL-10 y un autoantígeno de células β de islotes pancreáticos.
11. Composición según la reivindicación 10, que comprende además un anticuerpo anti-CD3.
- 30 12. Composición según la reivindicación 10 u 11, en la que dicho antígeno es insulina.
13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que dicho antígeno se administra mediante un microorganismo secretor de antígeno.
14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que dicho microorganismo es *Lactococcus lactis*.
- 35 15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en la que dicho anticuerpo anti-CD3, dicho antígeno, dicho microorganismo que expresa un antígeno y/o dicho microorganismo que expresa un compuesto inmunomodulador están presentes en un pulverizador, una cápsula, un aerosol, pastillas para chupar, un bolo, un comprimido, sobres, un líquido, una suspensión, una emulsión o trociscos.
- 40 16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, siendo dicha composición una composición farmacéutica.
17. Composición según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de diabetes tipo I en un mamífero.
18. Composición para su uso según la reivindicación 17, para su uso como alimento médico o nutraceutico.
19. Composición para su uso según la reivindicación 17 ó 18, que comprende además un anticuerpo anti-CD3.
- 45 20. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en la que dicho antígeno es insulina.
21. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en la que dicho antígeno se administra mediante un microorganismo secretor de antígeno.

22. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en la que dicho microorganismo es *Lactococcus lactis*.
- 5 23. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en la que dicho anticuerpo anti-CD3, dicho microorganismo secretor de IL-10, dicho antígeno y/o dicho microorganismo secretor de antígeno se administra durante al menos 1 día, preferiblemente durante al menos 1 semana, más preferiblemente durante al menos 1 mes o 1 año.
24. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, en la que dicho alimento médico o nutracéutico es para administración mucosa.
- 10 25. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, en la que dicho mamífero se elige del grupo que consiste en ratón, rata, perro, gato, ganado, caballo, cerdo y ser humano.

FIG 1

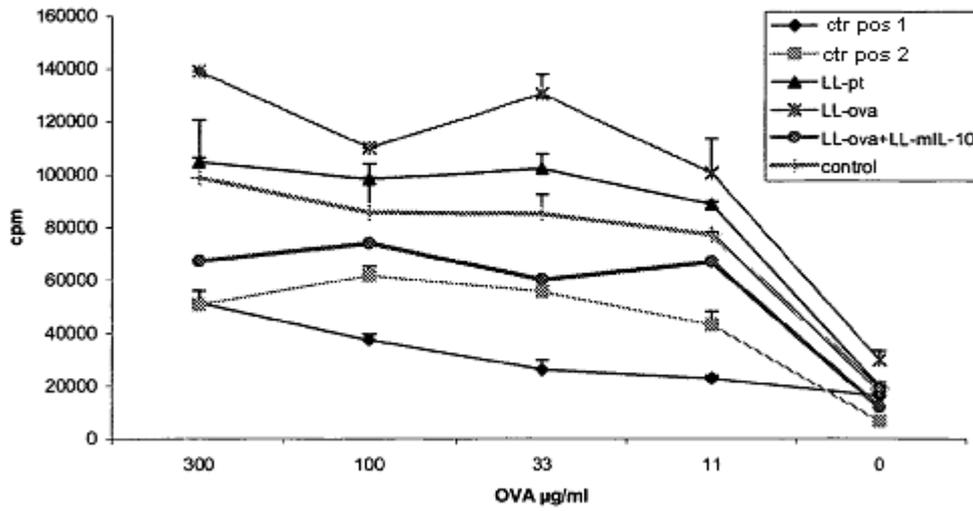


FIG 2A (a)

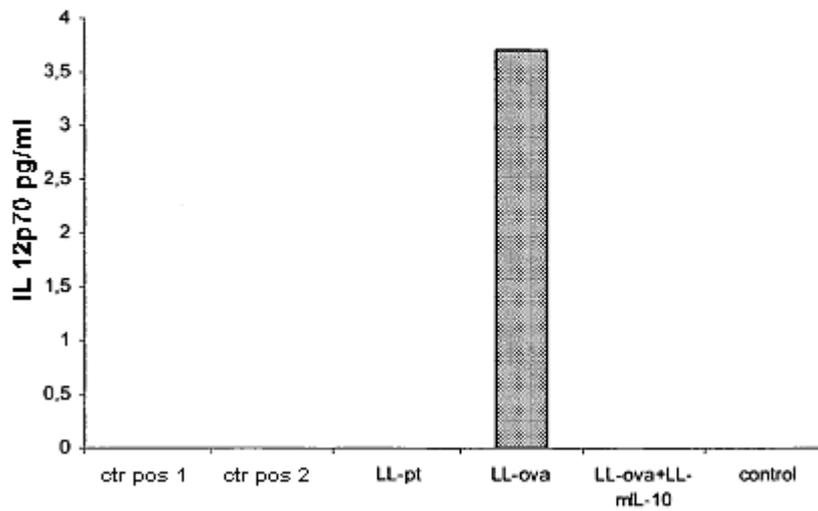


FIG 2A (b)

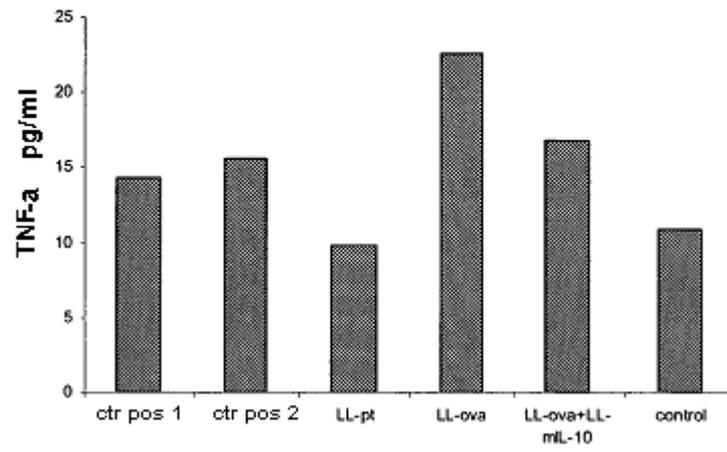


FIG 2A (c)

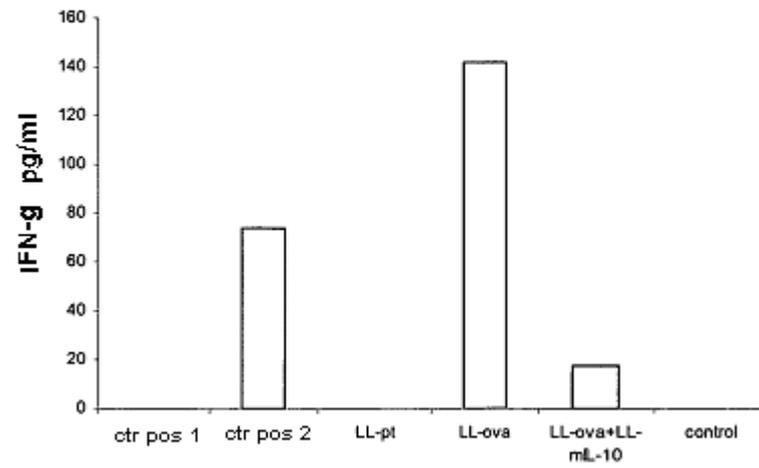


FIG 2A (d)

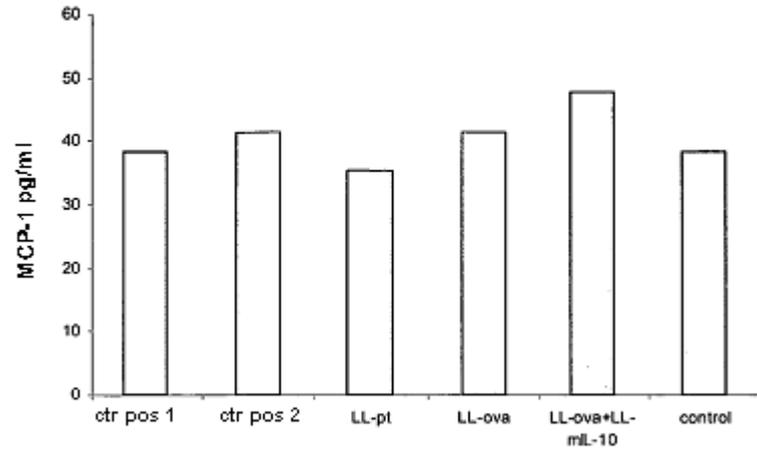


FIG 2A (e) no se detectó IL - 10

FIG 2A (f)

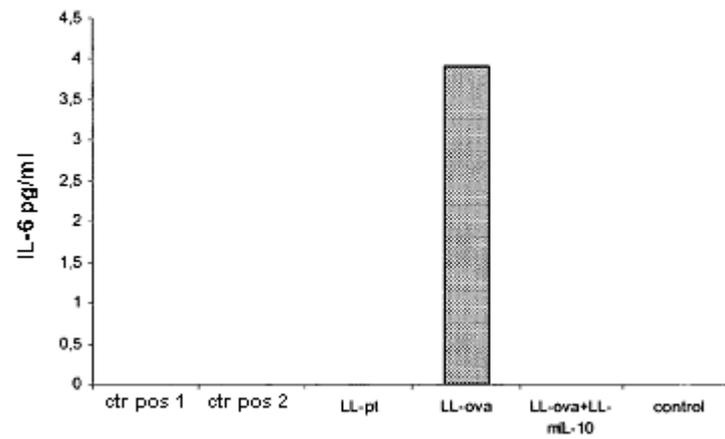


FIG 2B (a) sin detección de IL12p70

FIG 2B (b)

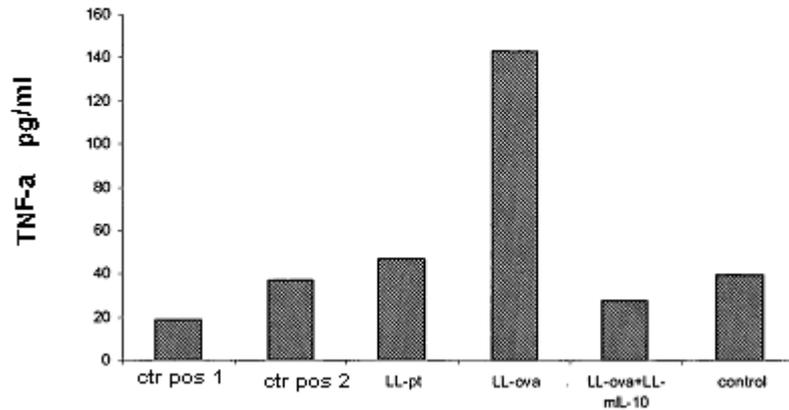


FIG 2B (c)

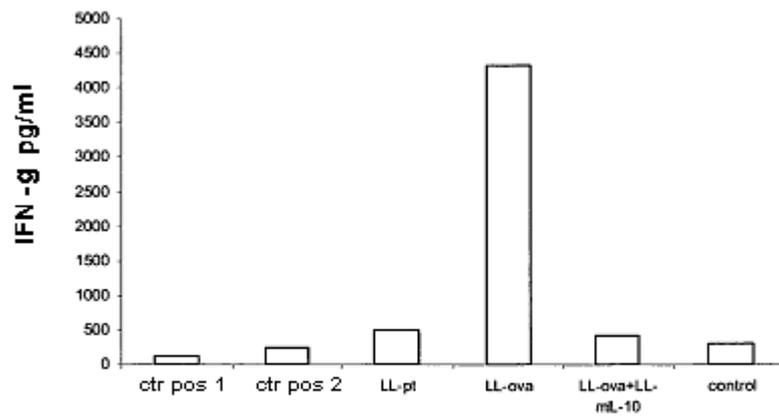


FIG 2B (d)

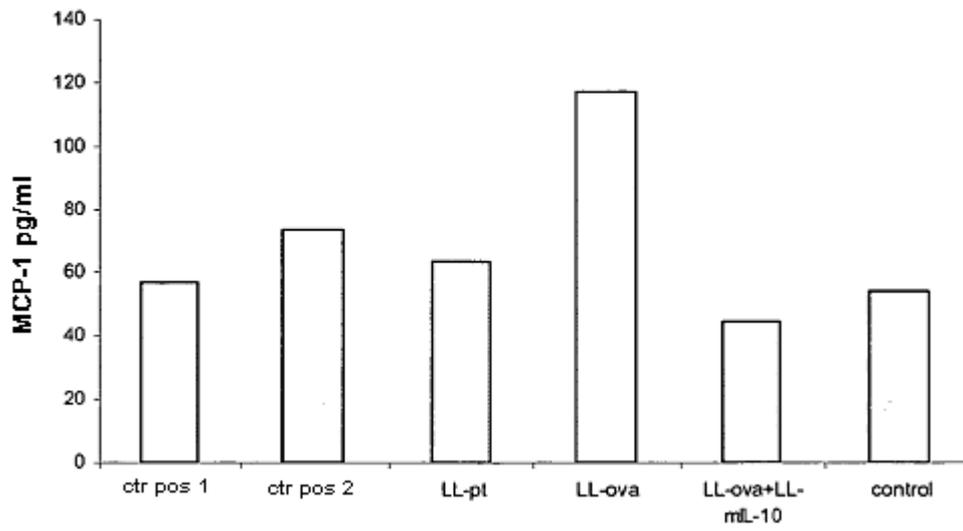


FIG 2B (e)

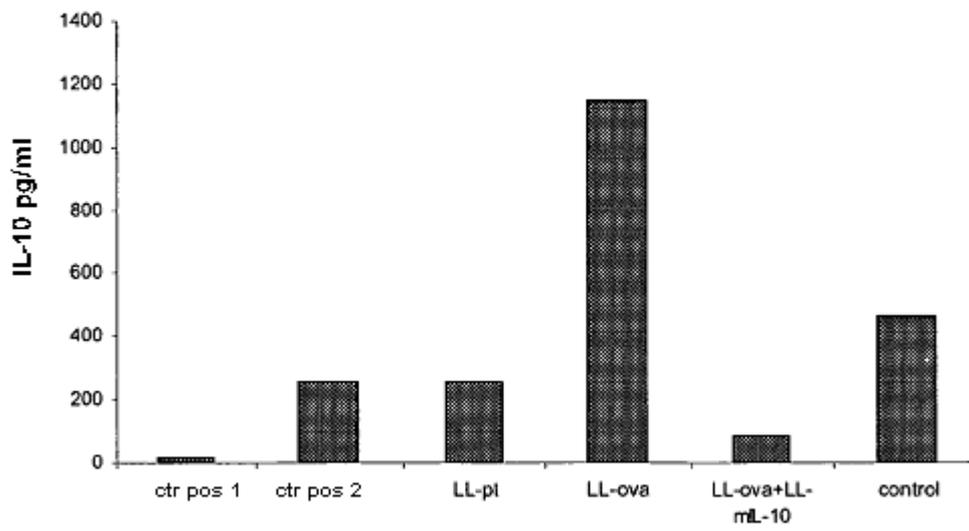


FIG 2B (f)

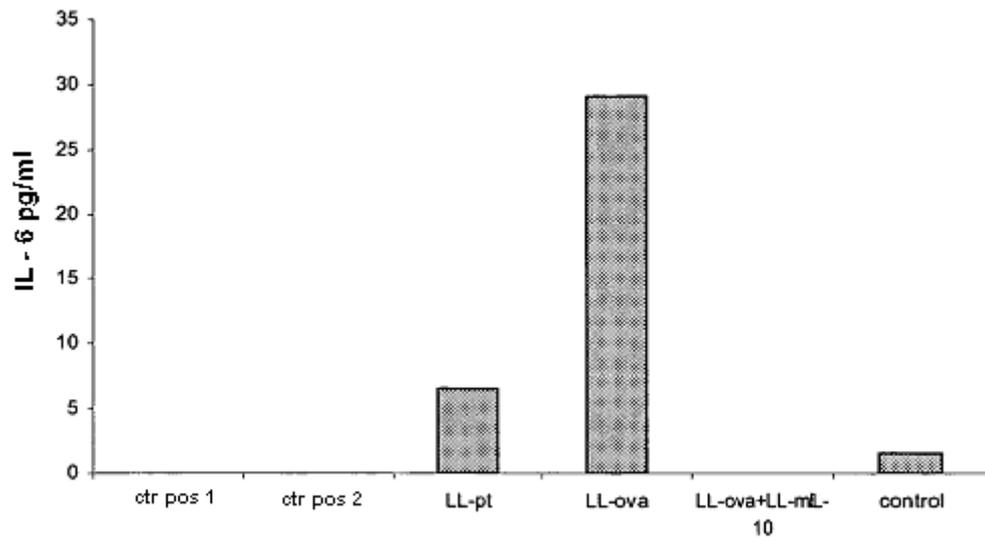


Fig. 3

