

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 492 468**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2008 E 08708224 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2125010**

54 Título: **Tratamiento de enfermedad inmunitaria por administración a través de la mucosa de antígenos usando Lactobacillus genéticamente modificado**

30 Prioridad:

25.01.2007 EP 07447006

19.07.2007 EP 07112792

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

09.09.2014

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 2 492 468 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

Tratamiento de enfermedad inmunitaria por administración a través de la mucosa de antígenos usando *Lactobacillus* genéticamente modificado

Descripción

- 5 La presente divulgación se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y alérgicas por la administración a través de la mucosa por microorganismos, en particular *Lactococcus lactis*, de antígenos inmunodominantes secretados.

Campo de la invención

10 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, gastrointestinales y genitourinarias, tiene la carga adicional de coexistir con una abundancia de bacterias y antígenos inocuos tales como alimento, antígenos transmitidos por el aire o la flora comensalmente bacteriana. Una característica clave del sistema inmunitario mucoso es su capacidad para seguir tolerante a estos antígenos mientras que retiene eficazmente la capacidad de repeler patógenos. La introducción de antígeno sistémicamente, tanto mediante inyección como lesión, conduce a infiltración local de células inflamatorias y producción de inmunoglobulinas específicas. Por el contrario, los antígenos introducidos en las superficies de la mucosa, tales como las vías gastrointestinales y genitourinarias, provocan la inhibición activa de la respuesta inmunitaria a aquellos antígenos sistémicamente. La inducción específica de estas respuestas reguladas por la administración de antígeno a través del tubo gastrointestinal se conoce como tolerancia oral. La administración por vía oral de antígeno puede conducir a falta de reactividad sistémica y es una alternativa atractiva a las invenciones médicas inmunosupresoras que no tienen efectos secundarios deseables (tal como esteroides). La invención se basa en particular en el campo de la tolerancia a baja dosis, obtenida por la exposición continuada a baja dosis de antígeno. Las inducciones de tolerancia mediante la mucosa se han propuesto como estrategia de tratamiento contra enfermedades autoinmunitarias, alérgicas e inflamatorias.

Estado de la materia

25 La siguiente discusión de los antecedentes de la invención se proporciona simplemente para ayudar al lector en el entendimiento de la invención y no se admite para describir o constituir técnica anterior a la presente invención.

30 Las enfermedades autoinmunitarias, alérgicas e inflamatorias imponen una tremenda carga al paciente y la sociedad, produciendo disminución de la calidad de vida y enormes costes. Además, no existe tratamiento adecuado sin efectos secundarios aceptables o que sea socialmente apropiado. Los actuales tratamientos para enfermedad autoinmunitaria son en gran medida paliativos, generalmente inmunosupresores, o antiinflamatorios. Las terapias no inmunitarias, tales como sustitución de hormonas en tiroiditis de Hashimoto o DM tipo 1 tratan desenlaces de la respuesta autoagresiva. El tratamiento con esteroides o AINE limita los síntomas inflamatorios de muchas enfermedades. IVIG se usa para CIDP y GBS. Se ha mostrado que las terapias inmunomoduladoras más específicas, tales como los antagonistas de TNF α etanercept, son útiles en el tratamiento de RA. Sin embargo, estas inmunoterapias pueden asociarse a riesgo elevado de efectos adversos, tales como elevada susceptibilidad a infección. La enfermedad celíaca, que puede caracterizarse por una pequeña inflamación intestinal crónica, sólo puede tratarse eficazmente por una dieta socialmente restrictiva que requiere abstinencia durante toda la vida de alimentos que contienen trigo, centeno o cebada. Aunque una estricta dieta sin gluten puede conducir a curar el intestino, la intolerancia al gluten es permanente.

40 La enfermedad celíaca, también conocida como celiacía o enteropatía sensible al gluten, es una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla a partir de una respuesta inmunitaria a granos dietéticos específicos que contienen gluten. El diagnóstico puede hacerse basándose en la presentación clásica de diarrea, heces grasosas, meteorismo y dolor abdominal, pérdida de peso, enfermedades óseas metabólicas, anemia, además de la presencia de anticuerpos del suero con especificidad por gliadina y transglutaminasa tisular (tTG) (también llamados antiendomisiales). La lesión de la mucosa está localizada en la parte proximal del intestino delgado, y se caracteriza por atrofia vellositaria, hiperplasia de células de la cripta e infiltración linfocítica del epitelio y la lámina propia, que liberan citocinas proinflamatorias tales como IL-2 y IFN- γ , en respuesta a gliadina. La enfermedad celíaca puede considerarse la enteropatía sensible a los alimentos más común en seres humanos, y puede aparecer en cualquier momento en la vida de una persona. La prevalencia está en el intervalo de 1:100 a 1:300 en poblaciones occidentales, árabes e indias. Aparte del gluten, la enfermedad puede desencadenarse por primera vez después de cirugía, infección vírica, tensión emocional grave, embarazo o parto. El documento WO 2007/063075 describe la inducción de tolerancia a α -gliadina tras la co-administración de *Lactococcus lactis* que secreta α -gliadina con IL-10.

50 Por tanto, la inducción de tolerancia oral específica para antígeno sería un enfoque terapéutico poco atractivo. Aunque la tolerancia oral se describió por primera vez en 1911, no fue hasta después de los años 70 que los investigadores empezaron a abordar los mecanismos implicados (Mayer y Shao, 2004a). Se han propuesto varios mecanismos para el desarrollo de la tolerancia oral, que oscilan de la deleción de linfocitos T antiespecíficos, pasando por la desviación

inmunitaria e inducción de anergia, a supresión por Treg (Mucida y col., 2005). La mayoría de los investigadores están de acuerdo con que hay dos formas distintas de obtener la tolerancia oral, la tolerancia a dosis alta, obtenida después de una única dosis alta de antígeno, que se basa en anergia y/o delección (Friedman y Weiner, 1994), y la tolerancia a dosis baja, obtenida por la exposición repetida a dosis baja de antígeno, mediada por la supresión activa de respuestas inmunitarias por linfocitos T CD4⁺, que incluyen linfocitos T reguladores productores de Foxp3⁺, IL-10 y/o TGF-β. Y, lo que es más importante, se ha mostrado que los linfocitos T reguladores inducidos por la tolerancia de la mucosa median en la supresión circunstancial, un proceso mediante el cual las células reguladoras específicas para una proteína suprimen la respuesta de células efectoras próximas a otra proteína. La supresión circunstancial es otra característica importante de la supresión inducida por antígenos debido a que el conjunto de antígenos que induce la autoinmunidad específica para órgano es muy desconocido, y supera el fenómeno de diseminación de epítomos. La diseminación de epítomos es una complicación de enfermedades autoinmunitarias y alérgicas por lo que el inicio de la respuesta inmunitaria se prolonga con el tiempo para incluir respuestas a otros antígenos.

La administración dirigida y más eficaz de moléculas para aplicaciones terapéuticas y profilácticas es una prioridad para la industria farmacéutica. Estrategias eficaces deben reducir la dosis requerida, aumentar la seguridad y mejorar la eficacia enfocando las moléculas en el sitio de acción deseado. Las vías mucosas de la 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 bajos niveles de absorción generalmente convierten esta vía de administración de fármacos de péptido y proteína en ineficaz. Vías mucosas alternativas tales como las vías nasales, rectales, pulmonares y oculares también están siendo investigadas.

Así, sigue existiendo un problema en la materia de inducir eficazmente la tolerancia de antígenos.

Resumen de la invención

Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que un antígeno inmunodominante que participa en la inducción de la enfermedad celíaca que se libera, y preferentemente está continuamente presente, en un sitio mucoso de un paciente induce una inmunotolerancia específica para antígeno. En particular, cuando un microorganismo tal como preferentemente *Lactococcus lactis* (LL), que expresa y secreta constitutivamente un antígeno inmunodominante que participa en la inducción de la enfermedad celíaca, se libera diariamente en un sitio mucoso, se indujo una tolerancia inmunitaria específica para antígeno. Los presentes inventores observaron que la administración a través de la mucosa de un tal antígeno por un microorganismo de *L. lactis* da una supresión significativamente mejor de la respuesta inmunitaria específica para antígeno en comparación con la única administración a través de la mucosa de dicho antígeno o dicho microorganismo.

Los presentes inventores demuestran que la invención puede inducir tolerancia oral con eficiencia mucho mayor que con la monoterapia con antígeno o *L. lactis* de control solo. La activación *in vivo* de los linfocitos T reguladores específicos para antígeno se potenció fuertemente. Específicamente, la administración a través de la mucosa de un péptido derivado de gliadina, que es inmunodominante para respuestas de linfocitos T mediadas por DQ8 por *L. lactis* genéticamente modificado, induce la supresión de respuestas de linfocitos T limitadas por DQ8 locales y sistémicas. El tratamiento produjo una disminución específica para antígeno de la capacidad proliferativa de los esplenocitos y células de los ganglios linfáticos inguinales, que fue críticamente dependiente de la producción de IL-10 y TGF-β y se asoció a una inducción significativa de linfocitos T reguladores Foxp3⁺. Debido a que este enfoque de bacterias que liberan antígeno tiene la capacidad de potenciar la tolerancia oral incluso en el entorno de hiperreactividad establecida, es aplicable al tratamiento de la enfermedad celíaca. La eficacia de la invención se demostró en modelos de ratón de enfermedad autoinmunitaria y alérgica, además de en el contexto de inactivación inmunitaria de agentes terapéuticos.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un microorganismo que secreta constitutivamente un antígeno que participa en la inducción de la enfermedad celíaca para su uso en la administración a través de la mucosa para tratar la enfermedad celíaca, con la condición de que cuando el microorganismo secreta constitutivamente dicho antígeno sea *Lactococcus lactis* MG1363 que secreta la proteína alfa-gliadina, péptido de gliadina HLA-DQ8 o péptido de gliadina HLA-DQ8 en forma desamidada, entonces dicho microorganismo no es para ser administrado por vía oral en combinación con *Lactococcus lactis* MG1363 que produce IL-10 murina.

En una realización, dicho microorganismo es:

- bacteria del ácido láctico o levadura, más preferentemente es *Lactococcus lactis* (LL);
- se administra diariamente;
- se administra durante al menos 1 semana, más preferentemente durante al menos 1 mes o 1 año;
- se administra al menos una vez al día, preferentemente dos veces al día;

- se administra en una dosis de al menos 10 femtogramos a 100 mg por día, tal como 100 fg a 10 mg por día, o 1 pg a 1 mg por día, o 10 pg a 100 µg por día, o 100 pg a 10 µg por día, o 1 ng a 1 µg por día, o 10 ng a 100 mg por día; y/o

5 - se administra por spray, cápsula, aerosol, pastillas para chupar, bolo, comprimido, sobres, líquido, suspensión, emulsión o trociscos.

En otra realización, dicha administración a través de la mucosa se elige del grupo que consiste en administración rectal, administración bucal, administración pulmonar, administración ocular, administración nasal, administración vaginal y administración oral.

10 En otra realización, dicho microorganismo o composición se formula como un medicamento, alimento médico o producto nutricional.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que consiste en un microorganismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho microorganismo secreta constitutivamente un antígeno, que participa en la inducción de la enfermedad celíaca.

15 En una realización, dicho microorganismo es la bacteria del ácido láctico o levadura, más preferentemente es *Lactococcus lactis* (LL).

En otra realización, dicho microorganismo está presente en una dosis de al menos 10 femtogramos a 100 mg, tal como 100 fg a 10 mg, o 1 pg a 1 mg, o 10 pg a 100 µg, o 100 pg a 10 µg, o 1 ng a 1 µg, o 10 ng a 100 mg.

En otra realización, dicha composición farmacéutica se formula en sprays, cápsulas, aerosoles, pastillas para chupar, bolo, comprimidos, sobres, líquidos, suspensiones, emulsiones o trociscos.

20 En otra realización más, la invención se refiere a la composición farmacéutica como se describe en el presente documento para su uso en la administración a través de la mucosa para tratar la enfermedad celíaca.

En otro aspecto, la invención se refiere a un medicamento, producto nutricional o alimento médico para tratar, prevenir y/o aliviar la enfermedad celíaca, que comprende al menos un microorganismo, en el que dicho microorganismo secreta constitutivamente un antígeno que participa en la inducción de la enfermedad celíaca, con la condición de que cuando el microorganismo que secreta constitutivamente dicho antígeno es *Lactococcus lactis* MG1363 que secreta la proteína alfa-gliadina, péptido de gliadina HLA-DQ8 o péptido de gliadina HLA-DQ8 en forma desamidada, entonces dicho microorganismo no es para ser administrado por vía oral en combinación con *Lactococcus lactis* MG1363 que produce IL-10 murina.

25

30 En una realización, dicho microorganismo es la bacteria del ácido láctico o levadura, más preferentemente es *Lactococcus lactis* (LL).

Descripción detallada de la invención

En toda la presente divulgación, diversas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas se citan por una cita identificadora. Las divulgaciones de estas publicaciones, patentes y memorias descriptivas de patentes publicadas se incorporan por este documento por referencia en la presente divulgación para describir más completamente el estado de la materia a la que se refiere la presente invención.

35

Técnicas generales

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 habilidad de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" segunda edición (Sambrook y col., 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 y col., eds., 1987, y boletines), "Polymerase Chain Reaction" (Mullis y col., eds., 1994); y "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan y col., eds., 1991).

40

45

Definiciones

Como se usa en el presente documento, ciertos términos pueden tener los siguientes significados definidos. Como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de

células, que incluyen mezclas de las mismas. Similarmente, el uso de “un compuesto” para el tratamiento o preparación de medicamentos como se describe en el presente documento contempla usar uno o más compuestos de la presente invención para tal tratamiento o preparación, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

5 Como se usa en el presente documento, el término “que comprende” pretende significar que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos citados, pero que no excluyen otros. “Que consiste esencialmente en” cuando se usa para definir composiciones y procedimientos debe significar que excluye otros elementos de cualquier significancia esencial para la combinación. Así, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se define en el presente documento no excluiría contaminantes traza del procedimiento de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. “Que
10 consiste en” debe significar que excluye más de oligoelementos de otros componentes y etapas de procedimiento sustanciales para administrar las composiciones de la presente invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la presente invención.

Invención

15 Los presentes inventores demuestran que la administración a través de la mucosa de un antígeno dominante inmunitario que participa en la inducción de la enfermedad celíaca secretado por un microorganismo tal como preferentemente *L. lactis* induce supresión de respuestas de linfocitos T locales y sistémicas. El tratamiento produjo una disminución específica para antígeno de la capacidad proliferativa de los esplenocitos y células de los ganglios linfáticos inguinales, que fue críticamente dependiente de la producción de IL-10 y TGF- β y se asoció a una inducción significativa de linfocitos reguladores *Foxp3*⁺. Este enfoque de bacterias que liberan antígeno tiene la capacidad de potenciar la tolerancia oral
20 incluso en el entorno de hiperreactividad establecida. Así, es aplicable para el tratamiento de la enfermedad celíaca. La eficacia de la invención se demostró en modelos de ratón de enfermedad autoinmunitaria y alérgica, además de en el contexto de inactivación inmunitaria de agentes terapéuticos.

En el presente documento se describe un procedimiento de inducción de tolerancia inmunitaria a un antígeno, que comprende la administración a través de la mucosa de dicho antígeno por un microorganismo.

25 La invención se refiere al uso de un microorganismo, preferentemente un microorganismo no patógeno, más preferentemente bacterias del ácido láctico o levadura, incluso más preferentemente *Lactococcus lactis* que secreta constitutivamente un antígeno que participa en la inducción de la enfermedad celíaca, para la preparación de un medicamento, alimento médico o producto nutricional para la administración a través de la mucosa para tratar la enfermedad celíaca en un paciente, con la condición de que cuando el microorganismo que secreta constitutivamente
30 dicho antígeno es *Lactococcus lactis* MG1363 que secreta la proteína alfa-gliadina, péptido de gliadina HLA-DQ8 o péptido de gliadina HLA-DQ8 en forma desamidada, entonces dicho microorganismo no es para administración por vía oral en combinación con *Lactococcus lactis* MG1363 que produce IL-10 murina, en el que dicho antígeno está preferentemente continuamente presente en dicho paciente.

35 Preferentemente, dicho antígeno se libera por un microorganismo que expresa antígeno. Preferentemente, dicho antígeno se libera por un microorganismo que secreta antígeno. En el presente documento también se describe un antígeno que se expresa en la superficie de dicho microorganismo que expresa antígeno, o dicho antígeno se libera tras la digestión.

Preferentemente, la presente invención se refiere al uso de un microorganismo que expresa antígeno para la preparación de un medicamento para la administración a través de la mucosa para inducir tolerancia inmunitaria.

40 Preferentemente, dicha tolerancia inmunitaria se induce en un paciente. Dicho paciente es preferentemente un animal. Dicho animal es preferentemente un mamífero, y preferentemente se elige del grupo que consiste en ratón, rata, cerdo, vaca, oveja, caballos y ser humano. Preferentemente, dicho mamífero es un ser humano. Preferentemente, dicha tolerancia inmunitaria es tolerancia de la mucosa.

Mucosa

45 *Mucosa* como se usa aquí puede ser cualquier mucosa tal como mucosa oral, mucosa rectal, mucosa uretral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa bucal, mucosa pulmonar y mucosa nasal. *Administración a través de la mucosa* como se usa en toda la solicitud engloba la administración a la mucosa. La administración a través de la mucosa oral incluye vías bucal, sublingual y gingival de administración. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento en el que dicha administración a través de la mucosa se elige del grupo que consiste en administración rectal, administración bucal, administración pulmonar, administración ocular, administración nasal, administración vaginal y administración oral.
50 Preferentemente, dicha administración a través de la mucosa es administración oral y dicha tolerancia es tolerancia oral.

Tolerancia de la mucosa como se usa aquí en toda la solicitud es la inhibición de la reactividad 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. Preferentemente, dicha tolerancia de la mucosa es tolerancia sistémica. La posterior exposición

del antígeno puede ser cada exposición conocida para el experto en la materia, tal como exposición mediante inyección parenteral, por administración a través de la mucosa o por producción endógena tal como en el caso de auto-antígenos. La *tolerancia oral* es la inhibición de la reactividad 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. *Tolerancia oral a dosis baja* es la tolerancia oral inducida por dosis bajas de antígenos, y se caracteriza por supresión inmunitaria activa, mediada por linfocitos T reguladores sensibles a ciclofosfamida que pueden transferir la tolerancia a huéspedes sin tratamiento previo. *Tolerancia oral a dosis alta* es la tolerancia oral inducida por dosis altas de antígenos, es insensible al tratamiento con ciclofosfamida y se desarrolla a inducción de hiporreactividad de linfocitos T mediante anergia y/o deleción de linfocitos T específicos para antígeno. La diferencia en la sensibilidad a la ciclofosfamida puede usarse para hacer una distinción entre tolerancia a dosis baja y a dosis alta (Strobel y col., 1983). Preferentemente, dicha tolerancia oral es tolerancia oral a dosis baja como se describe por Mayer y Shao (2004b).

Así, la presente invención se refiere a un uso como se describe en el presente documento, en el que dicha inducción de tolerancia inmunitaria es al menos 1,5, preferentemente 2, más preferentemente 3 veces o más con respecto a antes de dicha inducción. Alternativamente, dicho antígeno se tolera al menos 1,5, 2, 3 veces o más con respecto a antes de dicha inducción. La inducción de tolerancia inmunitaria puede medirse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Preferentemente, dicha inducción de tolerancia inmunitaria puede medirse por modulación de un nivel de citocinas en dicho animal. Como tal, la modulación puede ser un aumento de un nivel de citocinas, por ejemplo, dicho aumento de un nivel de citocinas es al menos 1,5, 2, 3 veces o más con respecto a antes de dicha inducción, por ejemplo, IL-10 o TGF- β . Alternativamente, dicha modulación es una disminución del nivel de un nivel de citocinas particular, por ejemplo, dicha disminución del nivel de citocinas es al menos 1,5, 2, 3 veces o más con respecto a antes de dicha inducción, por ejemplo, IL-12, IL-17 y IFN- γ . Las citocinas que se modulan pueden elegirse de cualquier citocina relevante, preferentemente dichas citocinas se eligen del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-23, TNF- α , IFN- γ , IFN- α , MCP-1, TGF- β , RANK-L y Flt3L.

Construcciones, administración e integración

En la presente invención, el microorganismo libera el antígeno en el sitio previsto, es decir, la mucosa. El microorganismo expresa dicho antígeno, tras lo cual el antígeno es constitutivamente secretado. Por tanto, en una realización preferida, el microorganismo, tal como *L. lactis*, comprende un vector de expresión que puede expresar el antígeno heterólogo, por ejemplo, el antígeno usado para inducir tolerancia inmunitaria, secretado en condiciones presentes en la mucosa prevista, por ejemplo, tal como en el tubo gastrointestinal. El microorganismo, por ejemplo, *L. lactis*, puede comprender vectores de expresión que pueden expresar el antígeno heterólogo secretado a un grado suficiente para inducir tolerancia inmunitaria. Se prevé un grado de expresión tan alto como sea posible sin dañar la viabilidad de la célula o el huésped que va a tratarse. Con mayor expresión pueden requerirse dosis menos frecuentes y menores para fines de tolerancia. Naturalmente, la pauta de dosificación no solo dependerá de la cantidad de antígeno, sino también del tipo de antígeno y la presencia o ausencia de otros factores estimulantes o supresores de la inmunogenicidad en la composición.

Normalmente, el sistema de expresión comprenderá una construcción genética que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno deseado, preferentemente operativamente ligado a un promotor que puede dirigir la expresión de la secuencia en el microorganismo huésped. Adecuadamente, el antígeno que va a expresarse puede codificarse por una secuencia de ácidos nucleicos que está adaptada al uso de codones preferido del huésped. La construcción puede contener adicionalmente (todos los) otro(s) elemento(s) adecuado(s), que incluye(n) potenciadores, secuencias de iniciación de la transcripción, secuencias señal, genes indicadores, secuencias de terminación de la transcripción, etc., operables en el huésped seleccionado, como se conoce para el experto en la materia. La construcción está preferentemente en una forma adecuada para la transformación del huésped y/o en una forma que puede mantenerse establemente en el huésped, tal como un vector, plásmido o mini-cromosoma. Pueden elegirse o construirse vectores adecuados que comprenden ácido nucleico para la introducción en microorganismos, por ejemplo, bacterias, que contienen secuencias reguladoras apropiadas que incluyen secuencias promotoras, fragmentos de terminador, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según convenga. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos, por ejemplo, fago, o fagémido, según convenga. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook y col., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Short Protocols in Molecular Biology, segunda edición, Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons, 1992. Las divulgaciones de Sambrook y col. y Ausubel y col. se incorporan en el presente documento por referencia. En una realización preferida, las secuencias codificantes para el polipéptido biológicamente activo y el antígeno están contenidas en un operón, es decir, una construcción de ácidos nucleicos para expresión multi-cistérica. En un operón, la transcripción de un promotor produce un ARNm que comprende más de una secuencia codificante, cada una con su propio sitio de unión a ribosoma adecuadamente posicionado en la dirección 5'. Así, más de un polipéptido puede traducirse de un único ARNm. El uso de un operón permite la expresión del polipéptido biológicamente activo y el antígeno que va a coordinarse. Más preferentemente, se usa una construcción de calidad alimentaria.

En una realización, la presente invención se refiere a microorganismos establemente transfectados, es decir, microorganismos en los que el gen que codifica el antígeno se ha integrado en el genoma del huésped. Se conocen en la técnica técnicas para establecer microorganismos establemente transfectados. Por ejemplo, el gen de interés puede clonarse en el genoma del huésped mediante recombinación homóloga. Preferentemente, un gen esencial del huésped está afectado por el evento de recombinación homóloga, tal como delección del gen, una o más sustituciones de aminoácidos que conducen a una forma inactiva de la proteína codificada por el gen esencial, o a una mutación por desplazamiento del marco que produce una forma truncada de la proteína codificada por el gen esencial. En una realización, el gen esencial es el gen *thyA*. Una técnica preferida se describe en el documento WO02/090551, que se incorpora específicamente en el presente documento en su totalidad. El plásmido transformante puede ser cualquier plásmido, en tanto que no pueda complementar el gen esencial afectado, por ejemplo, el gen *thyA*. El plásmido puede ser auto-replicante, llevando preferentemente uno o más genes de interés y uno o más marcadores de resistencia, o el plásmido es un plásmido integrante. En el último caso, el propio plásmido integrante puede usarse para afectar el gen esencial, produciendo la integración en el sitio del gen esencial, por ejemplo, el sitio de *thyA*, debido a que se afecta la función del gen esencial, por ejemplo, el gen *thyA*. Preferentemente, el gen esencial, tal como el gen *thyA*, está sustituido por recombinación homóloga doble por un casete que comprende el gen o genes de interés, flanqueados por secuencias que eligen diana que eligen como diana la inserción en el gen esencial, tal como el sitio diana *thyA*. Se apreciará que estas secuencias que eligen diana son suficientemente largas y suficientemente homólogas para permitir la integración del gen de interés en el sitio diana.

La construcción genética que codifica el antígeno de la invención puede así estar presente en la célula huésped extra-cromosómicamente, preferentemente de forma autónomamente replicante usando un origen de replicación propio, o puede integrarse en el ADN genómico microbiano, por ejemplo, cromosoma bacteriano o de levadura, por ejemplo, cromosoma de *Lactococcus*. En el último caso, una única copia o múltiples copias de dicho ácido nucleico pueden integrarse; la integración puede producirse en un sitio al azar del cromosoma o, como se ha descrito anteriormente, en un sitio predeterminado del mismo, preferentemente en un sitio predeterminado, tal como en un ejemplo no limitante preferido, en el sitio *thyA* de *Lactococcus*, por ejemplo, *Lactococcus lactis*.

Por tanto, en una realización, la construcción genética que codifica el antígeno de la invención puede comprender además secuencias configuradas para efectuar la inserción de dicha construcción genética en el genoma, por ejemplo, un cromosoma, de una célula huésped.

En un ejemplo, la inserción de la construcción genética en sitios particulares dentro de un genoma, por ejemplo cromosoma, de una célula huésped puede facilitarse por recombinación homóloga. Por ejemplo, la construcción genética de la invención puede comprender una o más regiones de homología a dicho sitio de integración dentro del genoma, por ejemplo, un cromosoma, de la célula huésped. La secuencia en dicho sitio del genoma, por ejemplo cromosoma, puede ser natural, es decir, que se produce en la naturaleza, o puede ser una secuencia exógena introducida por ingeniería genética previa.

Por ejemplo, dicha(s) región (regiones) de homología puede(n) tener al menos 50 pb, preferentemente al menos 100 pb, por ejemplo, al menos 200 pb, más preferentemente al menos 300 pb, por ejemplo, al menos 400 pb, incluso más preferentemente al menos 500 pb, por ejemplo, al menos 600 pb o al menos 700 pb, todavía más preferentemente al menos 800 pb, por ejemplo, al menos 900 pb, o al menos 1000 pb o más.

En un ejemplo preferido, dos regiones de homología pueden incluirse, una que flanquea cada lado de las unidades de expresión relevantes presentes en la construcción genética de la invención. Tal configuración puede insertar ventajosamente las secuencias relevantes, es decir, al menos las que codifican y efectúan la expresión del antígeno de interés, en células huésped. Las formas de realizar la recombinación homóloga, especialmente en huéspedes bacterianos, y seleccionar recombinantes, son generalmente conocidas en la técnica.

Los procedimientos de transformación de microorganismos son conocidos para el experto en la materia, tales como, por ejemplo, transformación y electroporación de protoplastos.

Puede lograrse un alto grado de expresión usando expresión homóloga y/o señales de secreción en los vectores de expresión presentes en el microorganismo, por ejemplo, *L. lactis*. Señales que regulan adecuadamente la expresión como están presentes en las construcciones en los ejemplos son útiles. Otras señales de expresión serán evidentes para el experto en la materia. El vector de expresión puede optimizarse para la expresión dependiendo del microorganismo en el que se incorpore, por ejemplo, *L. lactis*. Por ejemplo, se conocen vectores de expresión específicos que dan niveles suficientes de expresión en *Lactococcus*, *Lactobacillus lactis*, *casei* y *plantarum*. Además, se conocen sistemas que se han desarrollado para la expresión de antígenos heterólogos en la bacteria no patógena, no colonizante, de calidad alimentaria no invasiva *Lactococcus lactis* (véase la patente de RU GB2278358B, que se incorpora en el presente documento por referencia). Una construcción particularmente preferida según la invención comprende el vector de expresión de múltiples copias descrito en el documento PCT/NL95/00135 (documento WO-A-96/32487), en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno se ha incorporado. Una construcción tal es particularmente adecuada para la expresión de un

antígeno deseado en una bacteria del ácido láctico, en particular en *Lactobacillus*, a un alto nivel de expresión, y también puede usarse ventajosamente para dirigir el producto expresado a la superficie de la célula bacteriana. Las construcciones (por ejemplo, del documento PCT/NL95/00135) pueden caracterizarse porque la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno va precedida de una secuencia de ácidos nucleicos no traducida de 5' que comprende al menos la secuencia mínima requerida para el reconocimiento de ribosomas y la estabilización de ARN. Esto puede ir seguido de un codón de iniciación de la traducción que puede ir (inmediatamente) seguido de un fragmento de al menos 5 codones de la parte del extremo 5' de la secuencia de ácidos nucleicos traducida de un gen de una bacteria del ácido láctico o un equivalente estructural o funcional del fragmento. El fragmento también puede controlarse por un promotor. El contenido del documento PCT/NL95/00135, que incluye las diferentes realizaciones desveladas en su interior, y todos los otros documentos mencionados en esta memoria descriptiva, se incorporan en el presente documento por referencia. Un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento que permite la expresión regulada de alto nivel de genes heterólogos en el huésped y el acoplamiento de expresión a la secreción. En otra realización preferida, la ARN polimerasa del bacteriófago T7 y su promotor relacionado se usan para desarrollar un poderoso sistema de expresión según el documento WO93/17117, que se incorpora en el presente documento por referencia. Preferentemente, el plásmido de expresión se deriva de pT1 NX.

Un promotor empleado según la presente invención se expresa preferentemente constitutivamente en la bacteria. Los inventores observaron que la expresión constitutiva del antígeno produjo elevada tolerancia inmunitaria a diferencia de la expresión inducible. Además, el uso de un promotor constitutivo evita la necesidad de suministrar un inductor u otra señal reguladora para que la expresión tenga lugar. Preferentemente, un promotor dirige la expresión a un nivel a la que la célula huésped bacteriana sigue viable, es decir, retiene alguna actividad metabólica, aunque no se mantiene el crecimiento. Ventajosamente entonces, tal expresión puede ser a un bajo nivel. Por ejemplo, si el producto de expresión se acumula intracelularmente, el nivel de expresión puede conducir a acumulación del producto de expresión en menos de aproximadamente el 10 % de la proteína celular, preferentemente aproximadamente o inferior a aproximadamente el 5 %, por ejemplo, aproximadamente el 1-3 %. Un promotor puede ser homólogo a la bacteria empleada, es decir, una encontrada en esa bacteria en la naturaleza. Por ejemplo, un promotor lactocócico puede usarse en un lactococo. Un promotor preferido para su uso en *Lactococcus lactis* (u otros lactococos) es "P1" derivado del cromosoma de *Lactococcus lactis* (Waterfield, N R, Lepage, R W F, Wilson, P W y col. (1995)). The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis*. Gene 165(1), 9-15). Otro promotor preferido es el promotor usp45.

La construcción o construcciones de ácidos nucleicos pueden comprender una secuencia señal secretora. Así, en una realización preferida, el ácido nucleico que codifica un antígeno puede proporcionar la secreción de dicho antígeno (acoplando apropiadamente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una única secuencia a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno). La capacidad de una bacteria que aloja el ácido nucleico para secretar el antígeno puede probarse *in vitro* en condiciones de cultivo que mantienen la viabilidad del organismo. Secuencias señal secretoras preferidas incluyen cualquiera de aquellas con actividad en organismos Gram-positivos tales como *Bacillus*, *Clostridium* y *Lactobacillus*. Tales secuencias pueden incluir el conductor de la secreción de α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* o el conductor de la secreción de la enzima estafilocinasa secretada por algunas cepas de *Staphylococcus*, que se sabe que funciona en tanto huéspedes Gram-positivos como Gram-negativos (véase "Gene Expression Using Bacillus", Rapoport (1990) Current Opinion in Biotechnology1:21-27), o secuencias conductoras de numerosas otras enzimas de *Bacillus* o proteínas de la capa S (véanse las págs. 341-344 de Harwood y Cutting, "Molecular Biological Methods for Bacillus", John Wiley & Co. 1990). Preferentemente, dicha señal de secreción se deriva de usp45 (Van Asseldonk y col., 1993 Mol. Gen. Genet. 240:428-434). Preferentemente, dicho antígeno se secreta constitutivamente.

En una realización alternativa, las secuencias codificantes para el polipéptido biológicamente activo y el antígeno son parte del mismo vector de ácido nucleico, o vectores separados, y están individualmente bajo el control regulador de promotores separados. Los promotores pueden ser iguales o diferentes. Una construcción de ácidos nucleicos o vector que comprende una secuencia codificante para un polipéptido biológicamente activo y una secuencia codificante para un antígeno en el que cada secuencia codificante está bajo el control de un promotor para la expresión en un huésped no invasivo, por ejemplo, *Lactococcus*, tanto si es un operón como si no, se proporciona por otro aspecto de la presente invención.

Antígenos

La secuencia que codifica el antígeno que participa en la inducción de la enfermedad celíaca puede obtenerse de cualquier fuente natural y/o puede prepararse sintéticamente usando técnicas de síntesis de ADN muy conocidas. La secuencia que codifica el antígeno puede entonces (por ejemplo) incorporarse en un vector de expresión adecuado para proporcionar una construcción genética de la invención, que luego se usa para transformar o transfectar el huésped previsto. El recombinante así obtenido pueden entonces cultivarse, tras lo cual las células recogidas pueden usarse para formular la composición, opcionalmente después de más etapas de purificación y/o procesamiento, tales como liofilización para formar un polvo.

Un antígeno puede ser cualquier antígeno que participe en la inducción de la enfermedad celíaca conocida para el experto en la materia. Un antígeno como se usa aquí en toda la solicitud es preferentemente cualquier sustancia que provoque una respuesta inmunitaria cuando se introduzca en el cuerpo de un animal, en el que dicha respuesta inmunitaria puede ser respuesta mediada por linfocitos T y/o mediada por linfocitos B. El antígeno puede comprender un epítipo de linfocitos T y/o un epítipo de linfocitos B. La longitud del antígeno no es particularmente limitante, siempre que dicho antígeno pueda expresarse en el microorganismo de la invención. El antígeno puede ser una proteína o una parte de la misma, tal como un polipéptido o un péptido. Los antígenos según la invención incluyen epítopos lineales y/o conformacionales. Las respuestas mediadas por linfocitos T cubren respuestas Th1, Th2 y/o Th17. En el presente documento también se describen antígenos tales como, pero no se limitan a, alérgenos (que incluyen alérgenos alimentarios), alo-antígenos, antígenos propios, auto-antígenos y moléculas terapéuticas o antígenos que inducen una respuesta inmunitaria. También descrito en el presente documento, dicho antígeno participa en la inducción de enfermedades relacionadas con la respuesta inmunitaria. También descrito en el presente documento, dicho antígeno participa en la inducción de asma alérgica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, artritis reumatoide, alergia alimentaria o enfermedad de injerto contra huésped.

Los inventores observaron que los antígenos inmunodominantes secretados de la invención suprimen respuestas inflamatorias sistémicas de linfocitos T, y que estos antígenos son necesarios y suficientes para la inducción de un efecto tolerogénico significativo.

Los linfocitos T reguladores (Treg) desempeñan una función crítica en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia oral. La inducción de Treg es un objetivo importante para la inmunoterapia para varias enfermedades autoinmunitarias, alérgicas e inflamatorias. Las actuales estrategias para la inducción terapéutica de células supresoras específicas para antígeno se enfrentan a significativos obstáculos, y normalmente requieren arduas técnicas para aislar, manipular y transferir números adecuados de células reguladoras. El sistema de liberación de antígenos de microorganismo, por ejemplo, *L. lactis*, de la presente invención elude estos problemas e induce eficazmente Treg específicas para antígeno. En la presente invención se demostró que la inducción de Treg puede lograrse exponiendo el sistema inmunitario mucoso a dosis bajas de antígeno. La exposición a dosis bajas de antígeno es preferentemente una exposición continuada. Por tanto, la presente invención se refiere a antígenos que participan en la inducción de la enfermedad celíaca induciendo y/o expandiendo células Treg, preferentemente células Treg CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ y CD8⁺.

Se demostró adicionalmente en la presente invención que las células Treg que se indujeron y/o expandieron por los antígenos según la invención funcionan a través de un mecanismo dependiente de TGF-β y/o IL-10. Las pruebas previas han proporcionado que el TGF-β desempeña una función crítica en la tolerancia oral, además de en el desarrollo de Treg inducidas periféricas.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona antígenos inmunodominantes que participan en la inducción de la enfermedad celíaca que estimulan la expresión endógena de TGF-β y/o IL-10.

Además, se mostró que las células Th3 productoras de TGF-β específicas para antígeno accionan la diferenciación de células reguladoras *Foxp3*⁺ específicas para antígeno en la periferia. Además, se ha informado de la conversión dependiente de TGF-β de linfocitos T CD4⁺CD25⁻ periféricos en células supresoras CD25⁺, CD45RB^{-bajo}. Se mostró que la tolerancia oral inducida por Ag conjugado con CTB está asociada al aumento en TGF-β por la generación de tanto *Foxp3*⁺CD25⁺ como linfocitos T reguladores *Foxi3*⁺ y *Foxp3*CD25⁺CD4⁺. Estos datos sugieren una función clave de Treg 'adaptativas' *Foxp3*⁺ en la inducción y mantenimiento de la tolerancia oral. Los presentes inventores también muestran una significativa inducción de *Foxp3* de la mucosa. Además, el linfocito T regulador inducido por la 'mucosa' tiende a ser específico para antígeno ya que *L. lactis* solo es incapaz de inducir esta regulación por incremento de *Foxp3* dentro de TGLAI. Por consiguiente, la presente invención se refiere preferentemente a células Treg *Foxp3*⁺.

La presente invención demostró adicionalmente que las células Treg que se indujeron y/o expandieron por los antígenos según la invención disminuyeron la inflamación, en particular en células del bazo y de los ganglios linfáticos inguinales. Además, disminuyó la producción de IFN-γ e IL-12. Por consiguiente, la presente invención proporciona antígenos inmunodominantes que participaron en la inducción de la enfermedad celíaca que disminuyen la producción endógena de IFN-γ y/o IL-12 y/o estimulan la expresión endógena de TGF-β y/o IL-10. Además, la presente invención se refiere a antígenos que participaron en la inducción de la enfermedad celíaca que reducen la proliferación de células del bazo y/o de los ganglios linfáticos inguinales. Se apreciará que la presente invención se refiere también a antígenos que participan en la inducción de la enfermedad celíaca suprimiendo la respuesta inflamatoria de linfocitos T específicos para antígeno.

Se apreciará que ciertas isoformas de HLA-DQ se asocian más comúnmente a cierta enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, la pequeña inflamación intestinal crónica que define la enfermedad celíaca se caracteriza por una pérdida de tolerancia a péptidos del gluten ingeridos y se asocia fuertemente a una respuesta de linfocitos T limitada a HLA-DQ2 o HLA-DQ8. La expresión de HLA-DQ2 o HLA-DQ8 es necesaria para la expresión de celiacía, y confieren hasta el 40 % del riesgo genético en poblaciones occidentales. Uno de los aspectos más importantes en la patogénesis de la celiacía

es la activación de una respuesta inmunitaria de linfocitos T cooperadores 1, que se produce cuando las células presentadoras de antígeno que expresan moléculas de HLA-DQ2/DQ8 presentan péptidos del gluten a linfocitos T CD4⁺.

5 DQ8 destaca debido a su fuerte asociación con no solo la enfermedad celíaca, sino también diabetes juvenil. También está ligado a alelos de HLA-DR que participan en RA y pueden aumentar el riesgo. HLA-DQ no se disemina uniformemente y ciertas poblaciones tienen un riesgo elevado; sin embargo, entonces el riesgo es frecuentemente dependiente del entorno (consumo de gluten) y la elevada prevalencia de algunas enfermedades puede ser el resultado de desplazamiento de los individuos de entornos de bajo riesgo a entornos de mayor riesgo.

10 HLA-DQ8 según la invención es la representación serotípica de un haplotipo DQA1:DQB1. DQ8 representa los haplotipos DQA1*0301:DQB1*0302, DQA1*0302:DQB1* #0302, o haplotipos DQA1*0303:DQB1*0302. Estos haplotipos están asociados con alguna de la enfermedad autoinmunitaria más común conocida. DQA1*0301: DQB1*0302 es el más frecuente de estos 3 haplotipos y representa aproximadamente el 80 % de DQ8 global. Así, la presente invención se refiere a antígenos reconocidos mediante haplotipos DQA1*0301: DQB1*0302, DQA1*0302:DQB1*0302 y/o DQA1*0303:DQB1*0302, denominados "epítipo DQ8".

15 HLA-DQ2 se expresa en más del 90 % de las personas con la enfermedad celíaca. HLA DR3-DQ2 es la representación serotípica de un haplotipo HLA-DRB1: DQA1:DQB1. DR3-DQ2 representa principalmente el haplotipo DRB1*0301: DQA1*0501 :DQB1*0201. Es relativamente abundante en el hemisferio occidental. DQ2 está codificado por alelos DQB1 *02 en combinación con otros alelos alfa. Las dos cadenas β de DQ2 más comunes son muy similares. Así, la presente invención se refiere a antígenos que participan en la inducción de la enfermedad celíaca reconocida mediante haplotipos DQB1*0201, DQB1*0202 y/o DQB1*0203, denominados "epítipo DQ2".

20 La presente invención se refiere preferentemente a antígenos que participan en la inducción de la enfermedad celíaca que se derivan de glicoproteínas. Preferentemente, dichos antígenos se derivan de gliadina, preferentemente α-gliadina y/u hordeína. Las gliadinas, que pueden subdividirse en las α-, γ- y ω-gliadinas, y hordeína son muy conocidas en la técnica, y sus secuencias son fácilmente recuperables mediante bibliotecas de dominio público, tales como NCBI. Preferentemente, dicha α-gliadina se deriva de *Triticum*, tal como *T. aestivum* o *T. turgidum*.

25 La presente invención demuestra que los linfocitos T CD4⁺ reconocen péptidos del gluten nativos en el contexto de DQ2 o DQ8.

En una realización, la presente invención se refiere al epítipo DQ8:

QYPSGQGSFQPSQQNPQA, correspondiente a los residuos 203-220 de la secuencia recuperable mediante UniProtKB/TrEMBL entrada Q9M4L6 (SEQ ID N°: 4).

30 Dicho epítipo DQ8 nativo está preferentemente codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-caa tac cca tca ggt caa ggt tca ttc caa cca tca caa caa aac cca caa gct-3' (SEQ ID N°: 3)

En una realización la presente invención se refiere al epítipo DQ2:

LQLQFPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF, correspondiente a los residuos 57-89 de la secuencia recuperable mediante UniProtKB/TrEMBL entrada Q9M4L6 (SEQ ID N°: 8)

35 Dicho epítipo DQ2 está preferentemente codificado por la secuencia de nucleótidos

5'-tta caa tta caa cca ttc cca caa cca caa tta cca tac cca tta cca tac cca caa cca caa tta cca tac cca caa cca cca ttc (SEQ ID N°: 7)

40 Los antígenos se desamidán comúnmente en los intestinos por, por ejemplo, transglutaminasa tisular endógena. Los antígenos desamidados son más inmunorreactivos y fácilmente reconocidos que los antígenos que no están desamidados. La presencia de transglutaminasa tisular endógena es indiferente en caso de que los antígenos sean desamidados por otros medios. En una realización, la presente invención se refiere a antígenos desamidados que participan en la inducción de enfermedad celíaca, codificados por secuencias de nucleótidos en las que los codones para residuos de glutamina en epítipos son preferentemente sustituidos por codones para residuos de ácido glutámico.

En particular, la presente invención se refiere al epítipo DQ8 desamidado

45 QYPSGEGSFQPSQENPQA (SEQ ID N°: 2).

Dicho epítipo DQ8 desamidado está preferentemente codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-caa tac cca tca ggt gaa ggt tca ttc caa cca tca caagaa aac cca caa gct-3' (SEQ ID N°: 1)

En particular, la presente invención se refiere al epítipo DQ8 desamidado

LQL QPF PQP ELP YPQ PQL PYP QPE LPY PQP QPF (SEQ ID N°: 6)

Dicho epítipo DQ8 desamidado está preferentemente codificado por la secuencia de nucleótidos

5'-tta caa tta caa cca ttc cca caa cca **gaa** tta cca tac cca tta cca tac cca caa cca **gaa** tta cca tac cca caa cca cca ttc (SEQ ID N°: 5)

- 5 Se demostró adicionalmente que la presencia de secuencias adicionales, tales como una marca, para las secuencias de epítipo no influyó en la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, en otras realizaciones, dicho epítipo puede comprender adicionalmente aminoácidos, tales como, por ejemplo, 50 aminoácidos, 43, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácido(s). Por tanto, la presente invención se refiere a epítopos DQ8 que comprenden como máximo 50 aminoácidos adicionales. En otra realización, la presente invención se refiere a la secuencia de aminoácidos GAPVPYDPLEPRQYPSGEGSFQPSQENPQA (SEQ ID N°: 16) que comprende un epítipo DQ8 y una marca e (GAPVPYDPLEPR (SEQ ID N°: 31)).

Respuesta inmunitaria

- Una enfermedad relacionada con la respuesta inmunitaria como se usa aquí es una enfermedad producida por una respuesta inmunitaria no deseada del cuerpo contra un antígeno, por lo que dicho antígeno puede ser tanto un antígeno heterólogo como un auto-antígeno. Las enfermedades relacionadas con la respuesta inmunitaria incluyen, pero no se limitan a, reacción alérgica que incluye alergia alimentaria, enfermedad celíaca, asma alérgica, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, artritis reumatoide, diabetes tipo 1 y esclerosis múltiple. Las enfermedades relacionadas con la respuesta inmunitaria también incluyen reacciones inmunitarias no deseadas tales como enfermedad de injerto contra huésped o activación inmunitaria de la medicación tal como la producción de anticuerpos contra el factor VIII no endógeno. Según la invención, la enfermedad es la enfermedad celíaca. También en el presente documento se describen enfermedades relacionadas con la respuesta inmunitaria que incluyen, pero no se limitan a, reacción alérgica que incluye alergia alimentaria, asma alérgica, uveítis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, miastenia grave autoinmunitaria, artritis reumatoide, diabetes tipo 1 y esclerosis múltiple. Las enfermedades relacionadas con la respuesta inmunitaria también incluyen reacciones inmunitarias no deseadas tales como enfermedad de injerto contra huésped o inmuno-activación de la medicación tal como la producción de anticuerpos contra el factor VIII no endógeno.

Según la presente invención, el término “inmunodominante” se refiere a los antígenos de principio que inducen una respuesta inmunitaria.

- En vista de lo anterior, así se apreciará que la presente invención se refiere al uso como se describe en el presente documento, en el que dicho uso es terapéutico y/o profiláctico.

- Otro aspecto de la divulgación se refiere a un procedimiento para inducir tolerancia inmunitaria a un antígeno que participa en la inducción de la enfermedad celíaca, que comprende administración a través de la mucosa de dicho antígeno por un microorganismo en combinación con administración a través de la mucosa de un microorganismo que produce el compuesto inmunomodulador. El compuesto inmunomodulador y el antígeno pueden ser liberados por el mismo microorganismo, o pueden ser un microorganismo diferente.

Medicamento y administración

- Compuesto* significa cualquier compuesto químico o biológico o complejo, que incluye moléculas orgánicas e inorgánicas simples o complejas, péptidos, peptidomiméticos, proteínas, complejos de proteína, 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 como se usa aquí es un compuesto que induce tolerancia; la inducción de tolerancia puede obtenerse, como ejemplo no limitante, de una forma directa induciendo linfocitos T reguladores tales como Treg, Tr1 o Th3, o por desplazamiento del equilibrio de Th1/Th2 hacia Th1 o Th2, o inhibiendo Th17, o de una forma indirecta, por activación de células dendríticas inmaduras para tolerar células dendríticas y/o inhibir la respuesta inmunitaria de Th2 que induce la expresión de factores de “co-estimulación” sobre células dendríticas maduras. Los compuestos inmunomoduladores e inmunosupresores son conocidos para el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, metabolitos bacterianos tales como espergualina, metabolitos fúngicos y de *Streptomyces* tales como tacrolimus, rapamicina o ciclosporina, citocinas inmunosupresoras tales como IL-4, IL-10, IFN- α , TGF- β (como adyuvante selectivo para linfocitos T reguladores), Flt3L, TSLP, CTB y Rank-L (como anticuerpos inductores de DC tolerogénicos selectivos y/o antagonista tal como anti-CD40L, anti-CD25, anti-CD20, anti-IgE, anti-CD3, anti-IL-6 (o IL6R) y proteínas, péptidos o proteínas de fusión tales como la proteína de fusión CTL-4-Ig o CTLA-4-agonista.

Así, el compuesto inmunomodulador puede ser cualquier compuesto inmunomodulador conocido para el experto en la materia. Preferentemente, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto inmunosupresor, incluso más preferentemente dicho compuesto es una citocina inmunosupresora o anticuerpo. Preferentemente, dicha citocina

inmunosupresora es una citocina o anticuerpo que potencia la tolerancia. Las citocinas inmunosupresoras son conocidas para el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, IL-4, IL-10, IFN- α y TGF- β , como adyuvante selectivo para los linfocitos T reguladores; y Flt3L, TSLP, CTB y Rank-L, como inductores de DC tolerogénicos selectivos. Preferentemente, dicha citocina inmunosupresora está seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-10, IFN- α y Flt3L.

5 Se apreciará por el experto en la materia que la presente invención también se refiere a homólogos funcionales de las mismas. Un homólogo funcional connota una molécula que tiene esencialmente la misma función o similar, al menos para los fines previstos, pero puede diferenciarse estructuralmente. Lo más preferentemente, dicha citocina que potencia la tolerancia inmunosupresora es IL-10, o un homólogo funcional de la misma. Preferentemente, dicho anticuerpo inmunosupresor se elige del grupo que consiste en anti-IL-2, anti-IL12, anti-IL6, anti-IFN- γ .

10 *Administración* como se usa aquí significa cualquier procedimiento de administración conocido para el experto en la materia e incluye, pero no se limita a, formulaciones farmacéuticas recubiertas o no recubiertas del compuesto para administrar cápsulas, liposomas, esferosomas, partículas de polímero que comprenden o que llevan el compuesto para administrar o microorganismos que secretan, que muestran o que acumulan el compuesto a administrar, opcionalmente en presencia de compuestos que pueden potenciar la administración a través de la mucosa y/o captación de la mucosa.

15 Los compuestos o composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse en forma pura, combinarse con otros principios activos o combinarse con excipientes o vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones orales incluirán generalmente un vehículo de diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden incluirse aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos, enema y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o
20 compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente dispersante 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 edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja. Si la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal
25 como aceite graso. Además, formas unitarias de dosificación pueden contener diversos otros materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, Shellac o agentes entéricos. Además, el jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como edulcorante y ciertos conservantes, tintas, colorantes y aromatizantes. Se apreciará que la forma y carácter del vehículo farmacéuticamente aceptable están impuestos por la cantidad de principio activo con la que va a combinarse, la vía de administración y otras variables muy conocidas. El (Los) vehículo(s) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible(s) con los otros componentes de
30 formulación y no perjudicial(es) para el receptor de los mismos.

Preparaciones alternativas para administración incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son sulfóxido de dimetilo, alcoholes, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos
35 incluyen mezclas de alcoholes y agua, medios tamponados y solución salina. Vehículos intravenosos incluyen reforzadores fluidos y nutritivos, reforzadores de electrolitos tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes y similares. Son posibles diversas formulaciones líquidas para estos procedimientos de administración, que incluyen solución salina, alcohol, DMSO y disoluciones basadas en agua.

40 Preferentemente, dicho antígeno y/o dicha citocina inmunosupresora se expresan en bajas cantidades, preferentemente 0,1 μg o menores por dosis de bacteria administrada en un entorno experimental de ratón, cantidades tales que van a traducirse en un entorno de enfermedad humana.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares, como se usan en el presente documento, incluyen mejora o eliminación de la enfermedad celíaca desarrollada una vez se ha establecido o el alivio de los síntomas característicos de tal
45 enfermedad. Como se usa en el presente documento, estos términos también engloban, dependiendo de la condición del paciente, prevenir la aparición de la enfermedad celíaca o de síntomas asociados a la enfermedad celíaca, que incluyen reducir la gravedad de la enfermedad celíaca o síntomas asociados a la misma antes de la afección con dicha enfermedad. Tal prevención o reducción antes de afección se refiere a administración del compuesto o composición de la invención a un paciente que no está en el momento de la administración aquejado con la enfermedad. "Prevenir" también
50 engloba prevenir la reaparición o prevención de la recaída de la enfermedad celíaca o de síntomas asociados a la misma, por ejemplo, después de un periodo de mejora. Debe ser evidente que las condiciones mentales pueden ser responsables de síntomas físicos. A este respecto, el término "tratar" también incluye la prevención de la enfermedad celíaca o mejora o eliminación de la enfermedad celíaca desarrollada una vez se ha establecido o alivio de los síntomas característicos de tales afecciones.

55 Como se usa en el presente documento, el término "medicamento" también engloba los términos "fármaco", "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 el presente compuesto, es decir, el antígeno que participa en la inducción de la enfermedad celíaca, se libera o expresa en una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se indica para referirse a una cantidad de un compuesto o composición de la presente invención que provocará un efecto o respuesta terapéutico o profiláctico deseado cuando se administre según la pauta de tratamiento deseada. Se observa que cuando el antígeno inmunodominante que participa en la inducción de la enfermedad celíaca está continuamente presente, la respuesta inflamatoria de células específicas para antígeno se reduce incluso adicionalmente. Esta reducción es significativamente mayor en comparación con la administración del antígeno como tal, el microorganismo como tal, o la presencia no continua del antígeno. El término “continuamente presente” o “presencia continuada” según la invención se refiere a la presencia constante o ininterrumpida de un antígeno según invención en el sitio mucoso previsto, por ejemplo, el sitio de inflamación. La presencia del antígeno puede medirse por técnicas muy conocidas en la técnica, tales como PCR, ELISA o técnicas de inmunoprecipitación, tales como se detallan, por ejemplo, en la sección de ejemplos y arriba. Además, la presencia de *L. lactis* puede ser una medida de la presencia del antígeno. Por tanto, los efectos producidos por el antígeno pueden ser una medida de la presencia del antígeno, tal como, por ejemplo, la presencia o aumento de niveles de TGF- β o IL-10 endógeno, o una disminución de los niveles de IFN- γ o IL-12, o la presencia de células Treg, tal como se describe en el presente documento, o una disminución de la capacidad proliferativa de los esplenocitos y células de ganglios linfáticos drenantes. Así se apreciará que los niveles de antígeno pueden variar, mientras que el antígeno se considera todavía que está continuamente presente.

Preferentemente, el compuesto o composición se proporciona en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, un comprimido, cápsula, enema o dosis de aerosol medida, de manera que una dosis única se administra al sujeto, por ejemplo, un paciente.

Los principios activos pueden administrarse de 1 a 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 en los mismos momentos del día o diferentes que en total administran la dosis diaria especificada. Preferentemente, el principio activo se administra una vez o dos veces al día. Por ejemplo, podría tomarse una dosis por la mañana y una después en el día.

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 1 día hasta varios años (por ejemplo, durante toda la vida entera del mamífero); por ejemplo de 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). La administración de la dosis de mantenimiento diaria durante aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días o durante aproximadamente 1 semana a aproximadamente 1 año es típica. Otros constituyentes de las formulaciones líquidas pueden incluir conservantes, sales inorgánicas, ácidos, bases, tampones, nutrientes, vitaminas, u otros productos farmacéuticos.

El microorganismo que libera el antígeno puede administrarse en una dosis de al menos 10^4 unidades formadoras de colonias (ufc) a 10^{12} ufc por día, preferentemente entre 10^5 ufc a 10^{12} ufc por día, lo más preferentemente entre 10^9 ufc y 10^{12} ufc por día. Según el procedimiento como se describe en Steidler y col. (Science 2000), el antígeno y posiblemente el compuesto inmunomodulador de, por ejemplo, 10^9 ufc es secretado a al menos 1 ng a 100 ng. Mediante ELISA, conocido para un experto en la materia, el experto en la materia puede calcular el intervalo de secreción de antígeno en relación con cualquier otra dosis de ufc.

El antígeno que participa en la inducción de la enfermedad celíaca puede administrarse en una dosis que induce una respuesta a dosis baja. Preferentemente, dicho antígeno se libera en una dosis de al menos 10 fg a 500 μ g por día, preferentemente entre 1pg y 250 μ g por día, más preferentemente entre 100 pg y 200 μ g por día, o preferentemente 1 ng y 150 μ g, o más preferentemente 10 ng y 125 μ g por día, incluso más preferentemente 100 ng y 100 μ g por día, incluso más preferentemente 1 μ g y 90 μ g por día y lo más preferentemente entre 10 μ g y 75 μ g por día, tal como, por ejemplo, 25 μ g, 30 μ g, 40 μ g, 50 μ g, 60 μ g o 70 μ g por día.

Preferentemente, los compuestos o composición se proporcionan en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, un comprimido, disolución, cápsula o dosis de aerosol medida, de manera que una dosis única se administra al sujeto, por ejemplo, un paciente.

Dependiendo del modo de administración, por ejemplo oral, o cualquiera de los descritos anteriormente, el experto en la materia sabe cómo definir o calcular la dosis real que va a administrarse a un paciente. El experto en la materia será conocedor de ajustar las dosis dependiendo del paciente, microorganismo, vector, etc.

Los compuestos de la presente invención también pueden tomar la forma de una sal, hidrato, solvato o metabolito farmacológicamente aceptable. Sales farmacológicamente aceptables incluyen sales básicas de ácidos inorgánicos y orgánicos, que incluyen, pero no se limitan 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 ácido, tal como un grupo carboxi, entonces pares catiónicos farmacéuticamente aceptables adecuados para el grupo carboxi son muy conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio, amonio cuaternario y similares.

5 Microorganismo

El microorganismo según la invención puede ser cualquier microorganismo, que incluye bacterias, levaduras u hongos, adecuado para administración a través de la mucosa. Preferentemente, dicho microorganismo es un microorganismo no patógeno, incluso más preferentemente dicho microorganismo es un microorganismo probiótico. Los organismos probióticos son conocidos para el experto en la materia. Los organismos probióticos incluyen, pero no se limitan a, bacterias tales como *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp. y levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* subespecie *bouardii*. Preferentemente, dicha bacteria es una bacteria del ácido láctico; incluso más preferentemente dicha bacteria del ácido láctico se elige del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. En una realización adicionalmente preferida, dicho microorganismo es *Lactococcus lactis*. En otra realización preferida, dicha bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus* sp. En otra realización preferida, dicho microorganismo es *Saccharomyces cerevisiae*, incluso más preferentemente dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae* subesp. *bouardii*.

Lo más preferentemente, dicho microorganismo probiótico es una bacteria del ácido láctico, ya que la administración de proteínas heterólogas (es decir, proteínas bacterianas de no ácido láctico) por bacterias del ácido láctico en la mucosa, que incluyen tanto administración oral como vaginal, se ha descrito (Steidler y Rottiers, 2006; Liu y col., 2006), que hace que estas bacterias del ácido láctico sean extremadamente adecuadas para la administración de dicho antígeno y posiblemente dicho compuesto inmunosupresor. *L. lactis* es una bacteria no patógena, no invasiva, no colonizante Gram-positiva. Una variedad de cepas de *L. lactis* genéticamente modificado se genera para síntesis y administración local de proteínas inmunomoduladoras a la mucosa intestinal. Además, se establece un sistema de contención biológica que hace de la aplicación clínica de *L. lactis* manipulado por ingeniería genética una estrategia factible.

En una realización preferida, dicho microorganismo es mutante de *thyA* de *Lactococcus lactis*. Una realización especialmente preferida usa un mutante de *thyA* de *Lactococcus lactis*, en el que el gen que codifica el antígeno se ha usado para afectar el gen *thyA*.

Productos nutricéuticos y alimentos médicos

Se apreciará que los presentes compuestos y composiciones pueden usarse como productos nutricéuticos, alimento funcional o médico, o como aditivos en dichos productos nutricéuticos, alimento funcional o médico. Otra realización proporciona un alimento o bebida, preferentemente adecuados para consumo humano, que comprende un producto nutricéutico y un aromatizante, en el que el producto nutricéutico comprende un extracto de un producto agrícola.

Los productos nutricéuticos, tanto en forma de un extracto líquido como composición seca, son comestibles y pueden ser comidos directamente por los seres humanos, pero se proporcionan preferentemente a seres humanos en forma de aditivos o suplementos nutricionales, por ejemplo, en forma de comprimidos del tipo vendido en tiendas naturistas o como componentes en sólidos comestibles, más preferentemente productos alimenticios procesados tales como cereales, panes, tofú, galletas, helado, bizcochos, patatas, pretzels, queso, etc., y en líquidos bebibles, por ejemplo, bebidas tales como leche, sodas, bebidas isotónicas, zumos de frutas. Así, en una realización se proporciona un procedimiento para potenciar el valor nutritivo de un alimento o bebida mezclando el alimento o bebida con un producto nutricéutico en una cantidad que es eficaz para potenciar el valor nutritivo del alimento o bebida.

La divulgación proporciona además un procedimiento para potenciar el valor nutritivo de un alimento o bebida que comprende mezclar un alimento o una bebida con un producto nutricéutico para producir un alimento o bebida nutricionalmente potenciado, en el que el producto nutricéutico se mezcla en una cantidad eficaz para potenciar el valor nutritivo del alimento o bebida, en el que el producto nutricéutico comprende 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 aromatizante. Aromatizantes preferidos incluyen edulcorantes tales como azúcar, jarabe de maíz, fructosa, dextrosa, maltodextrosa, ciclamatos, sacarina, fenil-alanina, xilitol, sorbitol, maltitol y edulcorantes herbales, por ejemplo, estevia.

Los productos nutricéuticos descritos en el presente documento se prevén para consumo humano y así los procedimientos para obtenerlos son preferentemente realizados según Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) y cualquier reglamentación gubernamental aplicable que gobierne tales procedimientos. Procedimientos especialmente preferidos utilizan solo disolventes naturalmente derivados. Los productos nutricéuticos descritos en el presente documento contienen preferentemente niveles relativamente altos de sustancias beneficiosas para la salud. Los productos nutricéuticos pueden mezclarse entre sí para aumentar sus efectos beneficiosos para la salud.

A diferencia de los productos nutracéuticos, los llamados “alimento médicos” no están destinados a usarse por el público general y no están disponibles en tiendas o supermercados. Los alimentos médicos no son aquellos alimentos incluidos dentro de una dieta sana para reducir el riesgo de enfermedad, tales como alimentos de grasa reducida o alimentos bajos en sodio, ni son productos para la pérdida de peso. Un médico receta un alimento médico cuando un paciente tiene necesidades de nutrientes especiales con el fin de tratar una enfermedad o condición de salud, y el paciente está bajo el cuidado continuo del médico. La etiqueta debe establecer claramente que el producto pretende usarse para tratar un trastorno o afección médica específica. Un ejemplo de un alimento médico es un alimento médico nutricionalmente diverso diseñado para proporcionar soporte nutritivo dirigido para pacientes con afecciones inflamatorias crónicas. Los compuestos activos de este producto son, por ejemplo, uno o más de los compuestos descritos en el presente documento. Los alimentos funcionales pueden englobar aquellos alimentos incluidos dentro de una dieta sana para reducir el riesgo de enfermedad, tales como alimentos de grasa reducida o alimentos bajos en sodio, o productos para pérdida de peso. Por tanto, la presente invención contempla un alimento o bebida que comprende un producto nutracéutico según la invención.

Aquellos expertos en la materia apreciarán que pueden hacerse numerosos cambios y modificaciones a las realizaciones preferidas de la invención. Se pretende, por tanto, que las reivindicaciones adjuntas cubran todas aquellas variaciones equivalentes ya que se encuentran dentro del alcance de la invención.

Además, todos los términos usados en la descripción de compuestos de la presente divulgación tienen su significado como es muy conocido en la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: La alimentación por vía oral de LL-OVA reduce significativamente respuestas de HTR. Ratones Balb/c se sensibilizaron por inyección s.c. de OVA/CFA en los días 0 y recibieron una inmunización de refuerzo de OVA/IFA en el día 21. Los ratones se trataron por vía oral con BM9, LLpTREX1, LL-OVA y 1 µg de OVA en los días 7-11, 14-18, 21-25 y 28-31. En el día 31, los ratones se expusieron a 10 µg de OVA en 10 µl de solución salina en el pabellón auricular de las orejas. Las respuestas de HTR se expresaron como la diferencia en el espesor de la oreja antes y después de la exposición a OVA para ambas orejas 24 h después de la exposición.

Figura 2: La alimentación por vía oral de LL-OVA reduce significativamente la proliferación específica para OVA (**A**) y la producción de IFN- γ (**B**), IL-6 (**C**) e IL-10 (**D**) de esplenocitos en masa. Ratones Balb/c se sensibilizaron por inyección s.c. de OVA/CFA en los días 0 y recibieron una inmunización de refuerzo de OVA/IFA en el día 21. Los ratones se trataron por vía oral con BM9, LLpTREX1 y LL-OVA en los días 21-25 y 28-31. En el día 31, los esplenocitos en masa se aislaron y se probaron para la proliferación específica para OVA, que se expresa como las cpm medias \pm EEM a diferentes concentraciones de OVA y para la producción de IFN- γ , IL-6 e IL-10 después de 72 horas de la estimulación *ex vivo* con 100 µg/ml de OVA.

Figura 3: La alimentación por vía oral de LL-OVA reduce significativamente la proliferación específica para OVA de linfocitos T esplénicos CD4⁺. Ratones Balb/c se sensibilizaron por inyección s.c. de OVA/CFA en los días 0 y recibieron una inmunización de refuerzo de OVA/IFA en el día 21. Los ratones se trataron por vía oral con BM9 (**A**), LLpTREX1 (**B**) y LL-OVA (**C**) en los días 21-25 y 28-31. En el día 31, los esplenocitos en masa se aislaron y la proliferación específica para OVA de linfocitos T esplénicos CD4⁺ por CFSE y marcado con CD4-APC y análisis de citometría de flujo después de 90 h de la reestimulación *ex vivo* con 100 µg/ml de OVA.

Figura 4: Linfocitos T CD4⁺ de ratones tratados con LL-OVA transfieren tolerancia a receptores sin tratamiento previo. Ratones Balb/c se sensibilizaron por inyección s.c. de OVA/CFA en los días 0 y recibieron una inmunización de refuerzo de OVA/IFA en el día 21. Los ratones se trataron por vía oral con BM9, LLpTREX1 y LL-OVA en los días 21-25 y 28-31. En el día 31, los linfocitos T esplénicos CD4⁺ se aislaron y se probaron para la capacidad de transferencia de tolerancia. La transferencia de tolerancia por linfocitos T esplénicos CD4⁺ de ratones tratados con LL-OVA y LL-pTREX a los receptores sin tratamiento previo se evaluó sensibilizando y exponiendo el último a una respuesta de HTR, que se expresa como la diferencia en el espesor de la oreja antes y después de la exposición a OVA para ambas orejas 24 h después de la exposición.

Figura 5: Ratones transgénicos NOD AB^o DQ8 se inmunizaron por inyección s.c. de 100 µg de eDQ8d en CFA en el día 1. Los ratones se trataron por vía oral con LL-eDQ8d o LL-pT1 NX en los días 1-10. Los ratones de control recibieron BM9. En el día 10, los ratones se expusieron a 10 µg de eDQ8d en 10 µl de solución salina en el pabellón auricular de la oreja. Las respuestas de HTR se expresan como la media en el aumento 24 horas después de la inyección, tras la resta del espesor de la oreja antes de la exposición a eDQ8d. Los resultados resumen los datos de 3 experimentos independientes que incluyen 6 ratones por grupo.

Figura 6: Después de las mediciones de HTR, los bazo (**A**) y ganglios linfáticos inguinales (**B**) de los grupos de BM9 (control), LL-pT1NX y LL-eDQ8d se aislaron y se reestimularon *ex vivo* con 50 µg de péptido eDQ8d. La respuesta proliferativa específica para eDQ8d de esplenocitos en masa ($p=0,048$) y células de los ganglios linfáticos inguinales

($p=0,0022$) se expresaron como cpm medias.

Figura 7: Las medidas de citocinas en el sobrenadante de bazo (A) y células de los ganglios linfáticos inguinales (B) se realizaron 24 horas después de la reestimulación. Los resultados son medias de la secreción de citocinas en pg/ml representativas de al menos dos experimentos individuales.

5 **Figura 8:** La proliferación específica de eDQ8d esplénica disminuida depende de IL-10 y TGF- β .

EJEMPLOS

EJEMPLO A: Inducción de tolerancia específica para OVA por *Lactococcus lactis* genéticamente modificado que libera OVA para ratones naturales sensibilizados a OVA

Introducción

10 Para este fin, los presentes inventores manipularon por ingeniería genética LL que secreta OVA (LL-OVA) y evaluaron la inducción de tolerancia sistémica en un modelo terapéutico para autoinmunidad/alergia, concretamente el modelo de inmunización con OVA.

Materiales y procedimientos

15 **Bacterias y medios:** La cepa *Lactococcus lactis* MG1363 (LL) se modificó genéticamente y se usó en todo este estudio. Las bacterias se cultivaron en medio GM17E que consiste en caldo M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con 0,5 % de glucosa y 5 μ g/ml de eritromicina (Abbott). Las suspensiones madre de cepas de LL se almacenaron a -20 °C en 50 % de glicerol en medio GM17E. Las suspensiones madre se diluyeron 500 veces en medio GM17E y se incubaron a 30 °C durante la noche. En el plazo de 16 h alcanzaron una densidad de saturación de 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en medio BM9 a 2×10^{10} bacterias/ml. Cada ratón recibió 100 μ l de esta suspensión diariamente a través de un catéter intragástrico.

20 **Plásmidos:** La secuencia de ARNm que codifica albúmina de huevo de *Gallus gallus* se recuperó de Genbank (número de acceso AY223553) y de datos publicados. Se aisló ARN total de útero de pollo y se sintetizó ADNc usando 2 μ g de ARN total, cebadores oligo dT 2 μ M (Promega Corporation Benelux, Leiden, Los Países Bajos), DTT 0,01 mM (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Los 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. Un fragmento de ADNc de OVA se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes cebadores: directo 5'-GGCTCCATCGGTGCAGCAAGCATGGAATT-3' (SEQ ID N°: 9) e inverso 5'-ACTAGTTAAGGGGAAACACATCTGCCAAAGAAGAGAA-3' (SEQ ID N°: 10). Las condiciones de reacción fueron 94 °C durante 2 min seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 62 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 90 segundos. El fragmento amplificado se fusionó con la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, aguas abajo del promotor 17 de P1 lactocócico. Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que llevan ADNc de OVA se designaron OVA que secreta *L. lactis* (LL-OVA). *L. lactis*-pTREG1, que es MG1363 que contiene el vector vacío pTREG1, sirvió de control (LL-pTREG).

35 **Ratones:** Se obtuvieron ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad de Charles River Laboratories (Calco, Italia) y se alojaron en un animalario convencional bajo condiciones sin patógenos específicos. Los estudios animales se aprobaron por el Comité ético del Departamento de Investigación Biomédica Molecular en la Universidad de Gante (archivo n° 07/029).

Antígeno: Se usó proteína OVA de calidad V sin LPS intacta como antígeno en todos los experimentos (Sigma Aldrich).

40 **Inmunización de ratones e inducción de tolerancia oral:** Ratones Balb/c se inmunizaron por inyección s.c. de 100 μ g de OVA en 100 μ l de una mezcla 1:1 de CFA (Difco, BD Bioscience, Erembodegem, Bélgica) y solución salina en la base de la cola el primer día. LL-OVA, LL-pTREG1 o 1 μ g de OVA purificada disuelta en 100 μ l de BM9 se administraron diariamente en los días 7-11, 14-18, 21-25 y 28-31 (pauta 1) y en los días 21-25 y 28-31 (pauta 2). Los ratones de control recibieron solo BM9. Las suspensiones de antígeno o bacterianas se introdujeron en el estómago usando una aguja de alimentación para animales inoxidable de calibre 18. En el día 21, una inmunización de refuerzo se administró por inyección s.c. de 100 μ g de OVA en 100 μ l de una mezcla 1:1 de IFA (Sigma-Aldrich). La inducción de tolerancia se evaluó por respuestas de HTR, medición de citocinas y la proliferación específica para OVA, y experimentos de transferencia adoptiva.

50 **Respuestas de hiperreactividad tipo retardado:** Las respuestas de HTR específicas para antígeno se evaluaron mediante inyección de OVA en el día 31. Veinticuatro horas después se realizaron las mediciones de HTR. Para la medición de las respuestas de HTR específicas para antígeno, los ratones se expusieron a 10 μ g de OVA en 10 μ l de solución salina en el pabellón auricular de la oreja. La hinchazón de la oreja, definida como el aumento en el espesor de la oreja debido a la exposición, se midió de un modo cegado 24 h después de la exposición usando un micrómetro digital (Conrad, Bélgica).

Las respuestas de HTR se expresaron como la diferencia en el espesor de la oreja antes y después de la exposición a OVA para ambas orejas.

Proliferación específica para OVA y ensayos de citocinas: En el día 39, los bazoos se recogieron y los esplenocitos se evaluaron para la proliferación específica para OVA y producción de citocinas. Se prepararon suspensiones de células individuales de bazoos haciendo pasar las células a través de tamices celulares de 70 μm (Becton/Dickinson Labware). Los eritrocitos en las suspensiones de células se lisaron por incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos. Los linfocitos T CD4⁺ se enriquecieron usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ y columnas midiMACS (Miltenyi Biotec, Alemania).

Para ensayar la proliferación de poblaciones de esplenocitos totales, 2×10^5 células se cultivaron en placas de fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 μl de medio completo [es decir, RPMI-1640 que contiene 10 % de suero bovino fetal (SBF), 10 U/ml de penicilina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, L-glutamax 2 mM, piruvato de sodio 0,4 mM] tanto solo como con OVA, añadida a concentraciones que oscilan de 1,2 a 100 $\mu\text{g/ml}$. La proliferación se evaluó adicionalmente por marcado con 5,6-CFSE (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica). Los esplenocitos se resuspendieron en PBS a $10^7/\text{ml}$ y se incubaron en una concentración final de CFSE 10 μM durante 12 min a 37 °C. Las células marcadas se lavaron dos veces con medio completo frío en hielo antes de cultivarse a 2×10^5 células en placas de fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 μl de medio completo con 100 $\mu\text{g/ml}$ de OVA. Después de 90 h de cultivo a 37 °C y 5 % de CO₂ en una estufa de incubación humidificada, las células se recogieron y las células se tiñeron con anti-CD4 marcado con alofococianina (BD, Biosciences) y la proliferación se determinó usando citometría de flujo (FACSCanto, BD Biosciences).

Para ensayar la proliferación de linfocitos T CD4⁺, 2×10^5 células de linfocitos T CD4⁺ se cultivaron en placas de fondo en U de 96 pocillos con esplenocitos cargados con OVA tratados con mitomicina C, que actúan de células presentadoras de antígeno, a las relaciones 1/1, 1/0,3, 1/0,1, 1/0,03 y 1/0 en un volumen total de 200 μl de medio completo. Las células se cultivaron durante 90 h a 37 °C y 5 % de CO₂ en una estufa de incubación humidificada. Para los ensayos de proliferación, 1 $\mu\text{Ci/pocillo}$ de [³H]-timidina se añadió durante las últimas 18 h de cultivo, se recogió ADN sobre esteras de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la radiactividad unida al ADN se midió en un contador de centelleo (Perkin Elmer). Para medidas de citocinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación se recogieron después de 72 h de cultivo y se congelaron a -20 °C. La producción de citocinas se cuantificó usando Mouse Flex Set Cytometric Bead Array (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.).

Experimentos de transferencia adoptiva: En el día 39, los bazoos se recogieron de los grupos de tratamiento. Las suspensiones de células individuales se obtuvieron troceando los bazoos y filtrándolos a través de tamices celulares de 70 μm (Becton/Dickinson Labware). Las suspensiones de células se enriquecieron para linfocitos T CD4⁺, como se ha descrito anteriormente. Las células enriquecidas en CD4⁺ se transfirieron adoptivamente a ratones aceptores BALB/c sin tratamiento previo por la inyección i.v de 1×10^6 linfocitos T CD4⁺. Un día después de la transferencia adoptiva, todos los ratones se sensibilizaron mediante inyección de 100 μg de OVA/25 μl de solución salina/25 μl de IFA (Sigma-Aldrich) s.c. en la base de la cola, y 5 días a partir de aquí, los ratones se expusieron según el protocolo de HTR descrito anteriormente.

Análisis estadístico: La significancia de las diferencias entre grupos en los espesores de la oreja y las medidas de citocinas se probaron usando ANOVA unilateral. La significancia estadística se indica como * ($p < 0,05$) o ** ($p < 0,01$).

Resultados

LL-OVA potencia significativamente la capacidad inductora de tolerancia en el modelo de inmunización con OVA en comparación con OVA libre

Para estudiar la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentaron por vía oral como se ha descrito anteriormente. La administración de LL-OVA a ratones BALB/c sensibilizados a OVA condujo a una disminución significativa en la respuesta de HTR en comparación con los ratones de control sensibilizados (grupo BM9) y los ratones tratados con LL-pTREG1 o 1 μg de OVA purificada (**Figura 1**).

Estos datos fueron acompañados de una capacidad proliferativa disminuida significativa y producción de IFN- γ , IL-10 e IL-6 (**Figura 2**) de los esplenocitos en masa de ratones tratados con LL-OVA con respecto a grupos tratados con BM9 o LL-pTREG1.

LL-OVA potencia la tolerancia oral mediante linfocitos T CD4⁺

Para evaluar si los linfocitos T CD4 median o no en la inducción de tolerancia oral se estudió la respuesta de linfocitos T CD4 proliferativos específicos para OVA en los esplenocitos. La citometría de flujo demostró que solo el 0,8 % de los linfocitos T esplénicos CD4⁺ proliferan después de la reestimulación con OVA en el grupo de LL-OVA en comparación con el 4,5 % y el 11,6 % en los grupos de BM9 y LL-pTREG1 (**Figura 3**). Además, la transferencia adoptiva de linfocitos T esplénicos CD4⁺ del grupo tratado con LL-OVA a ratones BALB/c sin tratamiento previo demostró que estas células

podrían transferir tolerancia, ya que estas células fueron capaces de reducir la respuesta de HTR después de inmunizar y exponer los ratones aceptores a OVA (**Figura 4**).

Conclusión

5 Aquí, los presentes inventores demostraron que la administración intragástrica de *L. lactis* que secreta OVA suprime las respuesta de linfocitos T específicas para OVA mediante la inducción de CD4⁺ reguladoras. Los presentes inventores demostraron que esta inducción de tolerancia inmunitaria es más potente que la proteína OVA libre y que esta podría establecerse en un entorno terapéutico.

10 **EJEMPLO B: Inducción de tolerancia oral específica para antígeno por *Lactococcus lactis* genéticamente modificado administrando epítomos de gliadina inmunodominantes específicos para DQ8 a ratones transgénicos de clase II sensibilizados al gluten**

Introducción

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

25 La supresión inmunitaria específica para antígeno es una meta terapéutica atractiva para el tratamiento de la enfermedad celíaca. La administración activa de proteínas del gluten/péptidos recombinantes a la mucosa intestinal por *Lactococcus lactis* (LL) genéticamente modificado proporciona un novedoso enfoque terapéutico para la inducción de tolerancia. Para este fin, los presentes inventores manipularon por ingeniería genética LL que secreta el DQ8 desamidado (LL-eDQ8d) y evaluaron la respuesta inmunitaria local y sistémica en ratones transgénicos de clase II NOD AB^o DQ8 sensibilizados al gluten después de la suplementación oral.

30 Por tanto, los presentes inventores demuestran que la administración oral de *L. lactis* que produce el péptido gliadina suprime respuestas inmunitarias específicas para gliadina mediante la inducción de linfocitos T reguladores CD4⁺ específicos para antígeno.

Materiales y procedimientos

35 **Bacterias y medios:** La cepa *Lactococcus lactis* MG1363 (LL) se modificó genéticamente y se usó en todo este estudio. Las bacterias se cultivaron en medio GM17E, que era caldo M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con 0,5 % de glucosa y 5 μ g/ml de eritromicina (Abbott). Las suspensiones madre de cepas de LL se almacenaron a -20 °C en 50 % de glicerol en medio GM17E. Las suspensiones madre se diluyeron 200 veces en medio GM17E y se incubaron a 30 °C durante la noche. En el plazo de 16 h desde el cultivo se alcanzó una densidad de saturación de 2 x 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se concentraron 10 veces en tampón de inoculación BM9 a 2 x 10⁹ bacterias/100 μ l. Para el tratamiento, cada ratón recibió 100 μ l de esta suspensión diariamente por catéter intragástrico.

45 **Plásmidos:** La secuencia que codifica el epítipo DQ8 desamidado (que codifica DQ8d: caa tac cca tca ggt gaa ggt tca ttc caa cca tca caa gaa aac cca caa gct (SEQ ID N^o: 1)) se recuperó de datos publicados. En resumen, dos residuos de glutamina dentro del péptido de alfa-gliadina se cambiaron a ácidos glutámicos para estimular la respuesta de alfa-gliadina inmunodominante desamidada para los pacientes con enfermedad celíaca portadores de DQ8, y este epítipo es reconocido por linfocitos T de estos ratones. El fragmento de ADNc de DQ8d se construyó sintéticamente (Operon, Los Países Bajos) y se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes cebadores directo e inverso 5'-caataccatcagggtgaaggttc-3' (SEQ ID N^o: 11) y 5'-cgactagttaagctgtgggttttctgtgat-3' (SEQ ID N^o: 12). Para los fines de detección una marca e (e) se unió al fragmento, que consiste en la siguiente secuencia ggt gct cca gtt cca tac cca gat cca ctt gaa cca cgt (SEQ ID N^o: 13). Para añadir la marca e al extremo 5' del gen DQ8d, el producto de PCR que se produjo en la etapa 1 (DQ8d) se usó como molde en una PCR con oligonucleótidos 5'-gggtcctccagttccataccagatccactgaaccagctcaatccatca-3' (SEQ ID N^o: 14) y 5'-cgactagttaagctgtgggttttctgtgat-3' (SEQ ID N^o: 15). El fragmento amplificado se fusionó con la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, aguas abajo del promotor P1 lactocócico. Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que llevan ADNc de eDQ8d se designaron eDQ8d que secreta *Lactococcus lactis* (LL-eDQ8d). LL-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector

vacío pT1NX, sirvió de control.

Análisis funcional de epítomos secretados: Para el análisis funcional del epítomo eDQ8d secretado se realizó un ensayo de proliferación con clones de linfocitos T humanos derivados de los intestinos de pacientes con enfermedad celíaca (EC). Las bacterias se cultivaron durante la noche como se ha descrito antes, se diluyeron 1:50 y se cultivaron durante otras 4 ó 6 horas, respectivamente. Los clones de linfocitos T específicos para gluten se generaron a partir de una pequeña biopsia intestinal tomada del paciente S, un paciente con EC holandés adulto que había tomado una dieta sin gluten durante varios años. El paciente dio el consentimiento informado al estudio, que fue aprobado por el comité ético del hospital. El paciente se tipó serológicamente para ser HLA-DR3/4, DQ2/8, llevando así ambos dímeros DQ asociados a EC. Se encontró que el clon de linfocitos T II29 respondía a un péptido derivado de alfa-gliadina con un núcleo de 9 aminoácidos mínimo QGSFQPSQQ, cuando se une a HLA-DQ8. Se encontró que la desamidación del residuo de glutamina P1 y/o P9 (Q) en ácido glutámico (E) por la actividad de transglutaminasa tisular potenciaba sustancialmente la capacidad estimulante de los linfocitos T de este péptido del gluten. Los ensayos de proliferación se realizaron por duplicado o triplicado en 150 µl de medio de cultivo (Iscove) en placas de fondo en U de 96 pocillos (Falcon) usando 10⁴ linfocitos T estimulados con 10⁵ células mononucleares de sangre periférica del mismo HLA-DQ e irradiadas a 3000 RAD en ausencia o presencia de sobrenadante a varias concentraciones. Después de 48 horas, los cultivos se pulsaron con 0,5 uCi de ³H-timidina, se recogieron 18 horas a partir de aquí, tras lo cual la incorporación de ³H-timidina se determinó como una medida de la proliferación.

Ratones: Ratones transgénicos que expresan HLA-DQ8 en un contexto deficiente en MHC II endógeno (AB^o DQ8⁺) se retrocruzaron con ratones NOD durante 10 generaciones y se entrecruzaron para producir ratones NOD AB^o DQ8⁺ congénitos. Se usaron ratones de siete a dieciséis semanas de edad para los experimentos. Los ratones se destetaron y se mantuvieron en un animalario convencional hasta las 8-12 semanas de edad.

Antígeno y anticuerpos: Se sintetizaron epítomos DQ8 desamidados con **marca e** (GAPVYPDPLEPRQYPSGEGSFQPSQENPQA (SEQ ID N^o: 16)) y sin (QYPSGEGSFQPSQENPQA (SEQ ID N^o: 2)). Para el fenotipado de linfocitos T, los anticuerpos para CD4 y CD25 se compraron de BD-Biosciences (San Jose, CA), y los kits de tinción de APC anti-Foxp3 se compraron de eBiosciences (San Diego, EE.UU.), respectivamente. El anticuerpo monoclonal neutralizante anti-IL-10 (1 µg/ml, clon JES052A5), anticuerpo monoclonal neutralizante para TGF-β (1 µg/ml, clon 1D11) y los anticuerpos neutralizantes para LAP (1 µg/ml, clon 27235) se obtuvieron de R&D Systems (Mineápolis, MN).

Alimentación por vía oral y reacción de HTR (hiperreactividad tipo retardado): Ratones NOD AB^o DQ8 con un pienso sin gluten se sensibilizaron por inyección subcutánea de 100 µg de péptidos eDQ8 desamidados en 100 µl de 1:1 de CFA (comprado de Difco de Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA) y solución salina en la cola base en el día 1. El péptido usado para la sensibilización tuvo la misma secuencia que el epítomo secretado. Los ratones se alimentaron con BM9 como control negativo, LL-pT1NX o LL-eDQ8d [todos en los días 1-10 disueltos en 100 µl de BM9]. Las alimentaciones se realizaron por administraciones intragástricas de antígeno o suspensiones bacterianas usando una aguja de sonda nasogástrica inoxidable de calibre 18. Diez días después de la inmunización se evaluaron las respuestas de HTR específicas para antígeno. Veinticuatro horas a partir de aquí se realizaron mediciones de HTR. Para la medición de respuestas de HTR específicas para antígeno, los ratones se expusieron a 10 µg de eDQ8d en 100 µl de solución salina en el pabellón auricular de la oreja. El aumento en el espesor de la oreja se midió de un modo cegado usando un micrómetro de ingeniero (Mitutoyo, Tokio, Japón) 24 h después de la exposición. Las respuestas de HTR se expresaron como la diferencia en el aumento 24 horas después de la inyección de eDQ8d, tras la resta del espesor de la oreja antes de la exposición. Posteriormente, los ratones se sacrificaron, se recogieron el bazo y los ganglios linfáticos y las células se evaluaron para proliferación específica para DQ8d y producción de citocinas. Para la interferencia de la marca e, ratones NOD AB^o DQ8 se inmunizaron con 100 µg de péptidos DQ8 desamidados con (eDQ8d) o sin marca e (DQ8d) en 100 µl de 1:1 de adyuvante completo de Freund (CFA, Difco, BD) y solución salina en la cola base en el día 1. En el día 7, las mediciones de HTR de ratón se realizaron como se ha descrito anteriormente con 10 µg de DQ8d con o sin marca e, correspondientes al péptido usado para la inmunización.

Cultivos celulares, proliferación y ensayos de producción de citocinas: Suspensiones de células del bazo y ganglios linfáticos se prepararon en el día 11 del experimento homogeneizando el tejido con un molino de tejido en 1 X PBS. Los eritrocitos se eliminaron de las suspensiones de células del bazo por incubación con ACK (cloruro de amonio/potasio (tampón de lisis)). Las células se incubaron en placas de microtitulación de 96 pocillos a 5 x 10⁵ células/pocillo en volúmenes de 0,2 ml a 37 °C en RPMI 1640 (1,5 % de Hepes, 1 % de Penstrep y 10 % de SBF) con suplementos que contenían tanto medio solo, 10 µg de Con A como 50 µg de epítomo eDQ8d. En un experimento separado, anticuerpos neutralizantes para IL-10, TGF-β, IL10 y TGF-β o LAP se añadieron a esplenocitos de ratones tratados con LL-eDQ8d. Después de 24 h, la proliferación se evaluó por la adición de 1 µCi/pocillo de [³H]-timidina durante las últimas 24 h de cultivo. La radiactividad unida al ADN se recogió sobre esteras de filtro de fibra de vidrio y la incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo (Perkin Elmer). Los resultados se expresaron como cpm medias de pocillos por triplicado. Para medidas de citocinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación, descritos anteriormente, se recogieron después de 24 h de cultivo y se congelaron a -20 °C hasta que se

realizó el análisis de citocinas. La producción de citocinas se cuantificó usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences).

Análisis de citometría de flujo: Bazos y tejido de ganglio linfático asociado al intestino (TGLAI) de ratones tratados con BM9, LL-pT1NX o LL-eDQ8d se aislaron, se prepararon como se ha descrito anteriormente y se tiñeron para CD4, CD25 y *Foxp3*. La tinción intracelular se realizó para *Foxp3* según las instrucciones del fabricante (eBiosciences, San Diego, CA) y posteriormente se midió usando citometría de flujo en un FACSCaliburs de Becton Dickinson. Para el análisis, las células se regularon sobre subpoblaciones de CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ y dentro de estas poblaciones se usaron histogramas de *Foxp3* para determinar la intensidad media de fluorescencia (IMF).

Análisis estadístico: Los resultados de las medidas de citocinas se expresan como medias \pm EEM. La proliferación específica para eDQ8d, las medidas del espesor de la oreja y de citocinas se probaron para significancia usando ANOVA unilateral seguido de la comparación de la prueba de la t de Student: dos muestras que suponen varianza igual, para determinar las diferencias entre grupos individuales. Para todas las pruebas se usó un valor de $p < 0,05$: *, $< 0,01$: ** se usó para indicar significancia estadística para ambas pruebas.

Resultados

La administración a través de la mucosa de epítomos eDQ8d por *L. lactis* disminuye significativamente la respuesta de HTR inducida por DQ8d y la capacidad proliferativa de células del bazo y de los ganglios linfáticos inguinales en masa

La administración intragástrica diaria de LL-eDQ8d en ratones transgénicos de clase II NOD AB^o inmunizados con DQ8eDQ8d condujo a una disminución significativa en la respuesta de HTR en comparación con los ratones negativos de control sensibilizados (**Figura 5**). Los ratones de control (alimentados con BM9) se inmunizaron claramente con eDQ8d, pero la administración intragástrica diaria de LL-eDQ8d redujo significativamente la HTR ($13,1 \times 10^{-2}$ mm frente a $5,1 \times 10^{-2}$ mm, $p=0,0031$). La hinchazón de la oreja también se redujo ligeramente en ratones tratados con LL-pT1NX en comparación con controles ($9,3 \times 10^{-2}$ mm frente a $13,1 \times 10^{-2}$ mm, $p=0,0343$), pero a un grado mucho menor que en ratones tratados con LL-eDQ8d. Ratones NOD AB^o transgénicos no DQ8 mostraron solo un aumento menor en el espesor de la oreja ($3,2 \times 10^{-2}$ mm). Estos datos indican que LL-eDQ8d administrado por vía oral suprime las respuestas de linfocitos T inflamatorias sistémicas en ratones transgénicos NOD AB^o DQ8 inmunizados y que el antígeno secretado es necesario para la inducción de un efecto tolerogénico significativo. Estos datos fueron acompañados por una capacidad proliferativa disminuida significativa de los esplenocitos y células de los ganglios linfáticos inguinales (**Figura 6**). La reducida respuesta proliferativa fue acompañada de una significativa regulación por incremento de IL-10 y una regulación por disminución de la producción de IL-12 tras la estimulación por eDQ8d ex vivo de esplenocitos (**Figura 7**). Además, LL-eDQ8d redujo significativamente la producción de IFN- γ inducida por eDQ8d en los ganglios linfáticos inguinales en comparación con los ratones tratados con BM9 y LL-pT1NX. Juntos, estos datos indican que el tratamiento de LL-eDQ8d suprime la activación de linfocitos T tras la estimulación de eDQ8d y sugiere que también puede modularse la activación de DC.

La reducida proliferación esplénica de eDQ8d depende de IL-10 y TGF- β , y el tratamiento de LL-DQ8d aumenta significativamente la expresión esplénica y de *Foxp3* de TGLAI

La importancia funcional de TGF- β , IL-10 y LAP (TGF- β asociados a la membrana) sobre la respuesta proliferativa esplénica específica para eDQ8d se analizó usando anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes para IL-10, TGF- β o LAP no interfirieron significativamente con la disminución de la respuesta proliferativa esplénica de ratones tratados con LL-eDQ8d, pero la adición de una combinación de anticuerpos monoclonales neutralizantes para TGF- β e IL-10 abolió la disminución de la capacidad proliferativa específica para eDQ8d de los esplenocitos de ratones tratados con LL-eDQ8d (**Figura 8**). Estos datos sugieren fuertemente que el tratamiento con LL-eDQ8d puede suprimir la activación de linfocitos T en ratones transgénicos de clase II NOD AB^o DQ8 inmunizados con eDQ8d y que esta supresión depende de tanto IL-10 como TGF- β . Además, se observó una regulación por incremento significativa de *Foxp3* dentro de CD4⁺CD25⁺ esplénicas, además de la población de células CD4⁺CD25⁻ de los ratones tratados con LL-eDQ8d en comparación con el control (BM9) (IMF 171 frente a 61 y 35 frente a 6, respectivamente). Sorprendentemente, *Foxp3* también se reguló por incremento en la población de CD4⁺CD25⁻ en el tejido de ganglio linfático asociado al intestino (TGLAI) de los ratones tratados con LL-eDQ8d en comparación con los tratados con BM9 (IMF 73 frente a 30), pero no en la población CD4⁺CD25⁺ de TGLAI. La alimentación de LL-pT1NX también indujo alguna regulación por incremento de *Foxp3*, pero exclusivamente en la población de linfocitos T CD4⁺CD25⁻ esplénicos y a un menor grado que LL-eDQ8d (IMF 15 frente a 35, respectivamente).

Conclusión

Los datos de los presentes inventores demostraron que la administración a través de la mucosa de un péptido inmunodominante derivado de gliadina para respuestas de linfocitos T mediadas por DQ8 por *L. lactis* genéticamente modificado induce la supresión de respuestas de linfocitos T limitadas a DQ8 locales y sistémicas en ratones transgénicos de clase II NOD AB^o DQ8. El tratamiento produjo un disminución específica para antígeno de la capacidad proliferativa de

5 los esplenocitos y células de los ganglios linfáticos inguinales, que fue críticamente dependiente de la producción de IL-10 y TGF- β y se asoció a una inducción significativa de linfocitos T reguladores *Foxp3*⁺. Debido a que este enfoque de bacterias que liberan antígeno tiene la capacidad de potenciar la tolerancia oral incluso en el entorno de hiperreactividad establecida, puede aplicarse para el tratamiento de enfermedad celíaca y posiblemente otras enfermedades autoinmunitarias y/o alérgicas.

Epítipo DQ8 nativo

10 Los experimentos anteriores se repiten con el epítipo de α -gliadina nativa, es decir, QYPSGQGSFQPSQQNPQA (SEQ ID N°: 4), correspondiente a los residuos 203-220 de la secuencia recuperable mediante UniProtKB/TrEMBL entrada Q9M4L6. Dicho epítipo DQ8 nativo está codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-caa tac cca tca ggt caa ggt tca ttc caa cca tca caa caa aac cca caa gct-3' (SEQ ID N°: 3).

Los resultados con el epítipo DQ8 de α -gliadina nativa son esencialmente idénticos a los resultados descritos anteriormente para el epítipo DQ8 de α -gliadina desamidada.

Ensayo en pacientes celíacos usando el epítipo DQ8

15 En un estudio preliminar, *L. lactis* manipulado por ingeniería genética según la invención se usa como agente terapéutico en un ensayo en pacientes con enfermedad celíaca. Los hallazgos de los inventores proporcionan promesas de que este enfoque es eficaz en un modo específico para antígeno.

La enfermedad celíaca es una diana especialmente atractiva para este enfoque, debido a la capacidad de LL para administrar el antígeno en el sitio de la respuesta primaria para lograr tolerancia tanto directa como circunstancial.

Ensayo en pacientes celíacos usando el epítipo DQ2

20 No existen ratones transgénicos que expresen HLA-DQ2 en un entorno deficiente en MHC II endógeno comparable a ratones HLA-DQ8 como se usa anteriormente. Por consiguiente, los experimentos descritos anteriormente para los epítipos DQ8 no fueron posibles en un modelo de ratón apropiado. Por tanto, los presentes inventores realizan algunos experimentos preliminares en pacientes con enfermedad celíaca, usando tanto el epítipo DQ2 de α -gliadina nativa, además desamidada.

25 Específicamente, los experimentos anteriores se repiten usando:

Epítipo DQ8 desamidado LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQP (SEQ ID N°: 6), codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-tta caa tta caa cca ttc cca caa cca gaa tta cca tac cca tta cca tac cca caa cca gaa tta cca tac cca caa cca caa cca ttc (SEQ ID N°: 5)

30 y el epítipo DQ2 nativo: LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQP (SEQ ID N°: 8), codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-tta caa tta caa cca ttc cca caa cca caa tta cca tac cca tta cca tac cca caa cca caa tta cca tac cca caa cca caa cca ttc (SEQ ID N°: 7)

Los resultados con el epítipo DQ2 de α -gliadina nativa y desamidada se indican esencialmente en los resultados descritos anteriormente para los epítipos DQ8 de α -gliadina.

35 **EJEMPLO C: Inducción de tolerancia al factor VIII y factor IX de coagulación tras la administración por vía oral de *L. lactis* que secreta dicho factores**

Introducción

40 Varias proteínas terapéuticas (recombinantes), tales como interferón, factor VIII/IX y anticuerpos (Remicade), se administran a altas dosis durante periodos de tratamiento prolongados. Sin embargo, una complicación asociada a su uso es el desarrollo de respuestas inmunitarias específicas para proteínas tales como anticuerpos. Estos anticuerpos (Ab), también llamados inhibidores, hacen que las proteínas terapéuticas sean menos eficaces. Ejemplos incluyen la formación de inhibidores para factor VIII/IX en hemofilia, eritropoyetina (Epo) en pacientes que reciben terapia para insuficiencia renal crónica y IFN- en pacientes que reciben tratamiento para esclerosis múltiple. Aquí, los presentes inventores demuestran que la administración oral del factor VIII (y factor IX) por *L. lactis* suprime la formación de inhibidor a dicho factor mediante la inducción de linfocitos T reguladores CD4⁺ específicos para antígeno.

45 **Material y procedimientos**

Bacterias y plásmidos: La cepa MG1363 de *L. lactis* se usa en todo este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con 0,5 % de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se almacenan a -20 °C en 50 % de glicerol en GM17. Para las inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 200 veces en GM17 fresco 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. En todo este estudio se usan suspensiones bacterianas mixtas. Por tanto, las bacterias que se mezclan se recogen por centrifugación y los sedimentos de ambos cultivos bacterianos se concentran 10 veces en medio BM9 (Schotte, Steidler y col., 2000). Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 µl de esta suspensión por catéter intragástrico.

- 5 ADNc o fragmentos de ADNc de FVIII y FIX humano, que representan epítomos de linfocitos T CD4⁺ específicos para FVIII y FIX, se amplifican fusionados con la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, aguas abajo del promotor P1 lactocócico.

10 Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que llevan FVIII humano (y/o fragmento de epítomo), FIX (y/o fragmento de epítomo) se designaron *L. lactis* que secreta LL-FVIII, LL-FIX. LL-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1NX, sirven de control.

15 *Cuantificación de FVIII y FIX:* FVIII o FIX de LL-FVIII y LL-FIX, respectivamente, se determinan usando ensayo inmunoanálisis de adsorción (ELISA) específico para FVIII y FIX humano, que se han descrito previamente (Chuah y col., 2003). Las proteínas recombinantes también se analizan por análisis de transferencia Western y ensayos COATests y aPTT, como se describe (Chuah y col., 2003; Van den Driessche y col., 1999). El extremo NH₂ de esta proteína se determina por degradación de Edman automatizada. Como FVIII y FIX normalmente se expresan en el hígado en el que experimentan amplias modificaciones postraduccionales, los factores de coagulación producidos a partir de *L. lactis* manipulado por ingeniería pueden ser biológicamente 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 normalmente reconocen residuos de aminoácidos (Villard y col., 2003), en vez de restos glicosilados.

20 *Animales:* Ratones con hemofilia A o B obtenidos por inactivación de genes FVIII o FIX murinos usando recombinación homóloga en células ES como se describe por (Bi y col., (1995) y Wang y col., (1997)) se crían en el laboratorio. Estos ratones receptores generan anticuerpos neutralizantes cuando se exponen al antígeno de FVIII o FIX recombinante purificado en presencia de CFA (Mingozzi y col., 2003). El estado inhibitorio puede monitorizarse con el tiempo usando ensayos Bethesda o ELISA específicos para anti-FVIII/anti-FIX. Los ratones receptores expuestos a FVIII o FIX (+CFA) normalmente desarrollan inhibidores 2-3 semanas después de la exposición antigénica.

25 *Entorno experimental:* Ratones de 4-6 semanas de edad reciben FVIII, FIX, LL-FVIII, LL-FIX o LL-pT1NX o LL-OVA (un antígeno irrelevante) (1 ó 10 µg). Como control positivo para la inducción de tolerancia, los presentes inventores inyectan ratones con vectores víricos adenoasociados (AAV) que expresan FIX de un promotor específico para hepatocitos. Los ratones receptores desarrollan tolerancia inmunitaria específica para FIX que previene la inducción de anticuerpos anti-FIX tras la posterior exposición a FIX+CFA.

30 En un entorno profiláctico, FVIII, FIX, LL-FVIII, LL-FIX solos se administran por vía oral a ratones con hemofilia A o B usando un catéter gástrico, usando diferentes intervalos y dosis de tratamiento. Estos ratones receptores se exponen posteriormente al antígeno de FVIII o FIX recombinante purificado, en presencia de CFA (Mingozzi y col., 2003). Los animales de control se exponen a LL-pT1NX y LL-OVA. Se recoge el plasma por sangrado retro-orbital. El desarrollo de anticuerpos dirigidos contra FVIII o FIX se evalúa usando ensayos de Bethesda (Kasper y col., 1975) o usando un ELISA modificado específico para anti-FVIII o anti-FIX (Van den Driessche y col., 1999) a diferentes intervalos de tiempo.

35 En un entorno terapéutico, ratones con hemofilia A o B se inmunizan primero con FVIII o FIX, como se ha descrito (Mingozzi y col., 2003). El estado del inhibidor se monitoriza con el tiempo usando ensayos de Bethesda o ELISA específico para anti-FVIII/anti-FIX. Los ratones con títulos de inhibidor bajos o altos se tratan posteriormente con FVIII, FIX, LL-FVIII, LL-FIX solo usando diferentes intervalos y dosis de tratamiento y los títulos de inhibidor se determinan con el tiempo. La especificidad de la tolerancia inmunitaria posible se evalúa exponiendo los ratones que reciben FVIII, FIX, LL-FVIII, LL-FIX solo con un antígeno irrelevante (toxoides tetánico u OVA).

40 *Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas:* Se preparan suspensiones de células individuales de bazo y ganglios linfáticos haciendo pasar las células a través de tamices celulares filtrantes de 70 µm (Becton/Dickinson Labware). Los eritrocitos se eliminan de las suspensiones de células del bazo por incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos.

45 Ensayos de proliferación de poblaciones de esplenocitos totales, 2 x 10⁵ células se cultivan en placas de fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 µl de medio completo tanto solas como con FVIII o FIX purificado, y tanto con como sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF-β. FVIII y FIX se añaden a concentraciones que oscilan de 1 a 100 µg/ml. Los anticuerpos neutralizantes se añaden a 1, 0,1 y 0,01 µg/ml. Para los ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ y poblaciones de linfocito T CD4⁺CD25⁻, 0,2 x 10⁵ células de linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD4⁺CD25⁻ se cultivan en placas de fondo en U de 96 pocillos con 1 x 10⁵ células CD4⁺ irradiadas, que sirven de células presentadoras de antígeno, y FVIII o FIX (0 ó 100 µg/ml) en un volumen total de 200 µl de medio completo tanto con como sin anticuerpos neutralizantes. Después de 72 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂,

la proliferación se evalúa por la adición de 1 μCi /pocillo de [^3H]-timidina. La radiactividad unida al ADN se recoge 16-18 h más tarde sobre esteras de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

5 Para medidas de citocinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación se recogen después de 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelan a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se realiza el análisis de citocinas. La producción de citocinas se cuantifica usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.).

10 Ensayo de actividad reguladora de T *in vivo*: Con el fin de probar la supresión activa de la formación de anticuerpos en ratones, esplenocitos, linfocitos T CD4^+ purificados en perlas, linfocitos T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ o $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ aislados de diferentes grupos de *L. lactis* experimentales tratados se transfirieron adoptivamente a ratones C3H/HeJ sin tratamiento previo. Se usan ratones sin tratar como control. El número de células transfectadas es 10^7 para células completas del bazo, células del bazo agotadas en subpoblaciones o células CD4^+ positivamente seleccionadas y linfocitos T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ y $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$. Ratones receptores ($n=4-5$ por cohorte experimental) se inyectaron subcutáneamente con 5 μg de hF.IX en CFA 36 horas después de la transferencia adoptiva. Los títulos de IgG anti-hF.IX en plasma se midieron 2,5 semanas después de la inmunización.

Resultados

LL-FVIII y LL-IX potencian significativamente la capacidad inductora de tolerancia en ratones con hemofilia A o B en comparación con FVIII o FIX libre

20 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (entorno experimental). La adición de LL-FVIII o LL-FIX potencia significativamente la inducción de tolerancia hacia FVIII y FIX ya que la respuesta proliferativa específica para factor de esplenocitos se reduce significativamente en este grupo en comparación con los grupos de FVIII y FIX de control y libres.

LL-FIIIV y LL-FIX potencian la tolerancia oral en asociación con títulos específicos para FVIII y FIX reducidos y producción de $\text{IFN-}\gamma$ y más IL-10 y $\text{TGF-}\beta$ en respuesta a dicho factor

25 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (*entorno experimental*). Los anticuerpos específicos para FVIII y FIX y la producción de citocinas en respuesta a dicho factor en esplenocitos y ganglios linfáticos se cuantifican como se ha descrito anteriormente. La formación de inhibidor y la producción de la citocina proinflamatoria $\text{IFN-}\gamma$ se reduce fuertemente y las citocinas inmunosupresoras IL-10 y $\text{TGF-}\beta$ aumentan significativamente en el grupo de LL-FVIII/FIX en comparación con grupos de control y de FVIII/IX libre.

30 LL-FVIII/FIX potencia la tolerancia oral mediante linfocitos T CD4^+

35 Para evaluar si los linfocitos T CD4^+ median o no en la inducción de tolerancia oral, la respuesta de linfocitos T CD4^+ proliferativa específica para factor se estudia en los esplenocitos y ganglios linfáticos. Por tanto, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (*entorno experimental*) y la proliferación de linfocitos T CD4^+ específica para factor se determina como se ha descrito en *Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas*. La respuesta de linfocitos T CD4^+ específicos para factor en el grupo de LL-FVIII/FIX se reduce significativamente en comparación con grupos de control y de FVIII/IX libre.

Linfocitos T reguladores inducidos por antígeno tras la terapia con LL-FVIII/FIX pueden transferir protección de la formación de inhibidores *in vivo*

40 Con el fin de probar la supresión activa de la formación de anticuerpos en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, los presentes inventores transfieren adoptivamente esplenocitos de los diferentes grupos tratados como se ha descrito anteriormente (*ensayo de actividad reguladora de T in vivo*). En comparación con controles y grupos de FVIII/IX libre, la formación de anti-IgG de factor se reduce significativamente en el grupo de LL-FVIII/FIX, que indica activación de linfocitos T CD4^+ reguladores en el protocolo de tolerancia oral de combinación de los presentes inventores.

Conclusión

45 Los datos de los presentes inventores demuestran que la administración a través de la mucosa de *L. lactis* que secreta FVIII o FIX recombinante es más potente que FVIII o FIX en suprimir la formación de inhibidores específicos para FVIII y FIX en ratones con hemofilia A y B, respectivamente.

EJEMPLO D: Inducción de tolerancia a un alérgeno, Der p 1, tras la administración por vía oral de *L. lactis* que secreta dicho alérgeno

50 **Introducción**

El asma alérgica es un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias. Se caracteriza por obstrucción reversible de las vías respiratorias, elevados niveles en suero de inmunoglobulina E específica para alérgeno, hipersecreción mucosa e hiperreactividad de las vías respiratorias (HVR) a estímulos broncoespasmogénicos. Sus síntomas empeoran por 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 cooperadores T tipo 2 (Th2) desempeñan una función crucial en el inicio, la progresión y la persistencia de la enfermedad. Datos actuales sugieren que las respuestas de Th2 a alérgenos normalmente se suprimen por linfocitos T reguladores. Además, la supresión por este subconjunto disminuye en individuos alérgicos. Aquí, los presentes inventores demuestran que la administración oral de alérgeno por *L. lactis* suprime respuestas similares a asma mediante la inducción de linfocitos T reguladores CD4⁺ específicos para antígeno.

10 **Material y procedimientos**

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

Modelo de alérgeno Ova: Ratones sensibilizados a OVA se exponen mediante inhalación a aerosol de OVA que conduce a inflamación eosinófila de las vías respiratorias dependiente de citocinas Th2, hiperreactividad bronquial y producción de IgE, hallazgos altamente característicos de asma alérgica humana (Brusselle, 1994, Clin Exp Allergy 24:73; Kips y col., 1996, Am J Respir Crit Care Med 153:535; Brusselle y col., 1995, Am J Respir Cell Mol Biol 12:254).

Bacterias: La cepa MG1363 de *L. lactis* se usa en todo este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con 0,5 % de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se almacenan a -20 °C en 50 % de glicerol en GM17. Para inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 500 veces en GM17 fresco y se incuban a 30 °C. Se alcanzó una densidad de saturación de 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en el plazo de 16 horas. Las bacterias se recogen por centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 µl de esta suspensión diariamente por catéter intragástrico.

Plásmidos: La secuencia de ARNm que codifica albúmina de huevo de *Gallus gallus* se recupera de Genbank (número de acceso AY223553). Se aísla ARN total de útero de pollo y se sintetiza ADNc usando 2 µg de ARN total, cebadores oligo dT 2 µM (Promega Corporation Benelux, Leiden, Los Países Bajos), DTT 0,01 mM (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Los 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 µl. El fragmento de ADNc de OVA se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 min seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 62 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 90 segundos, con los siguientes cebadores directos e inversos 5'-GGCTCCATCGGTGCAGCAAGCATGGAATT-3' (SEQ ID N°: 17) y 5'-ACTAGTTAAGGGGAAAC-ACATCTGCCAAAGAAGAGAA-3' (SEQ ID N°: 18).

El fragmento amplificado está fusionado con la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, aguas abajo del promotor P1 lactocócico.

Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que llevan ADNc de OVA se designan LL-OVA. LL-pTREX1, que es MG1363 que contiene el vector vacío, sirve de control.

Cuantificación de OVA: OVA de LL-OVA se determina usando un ensayo inmunoanalítico de adsorción (ELISA) específico para OVA desarrollado internamente. La producción de las proteínas recombinantes también se evalúa por análisis de transferencia Western.

Ratones: Se compran ratones BALB/c (6 a 8 semanas de edad) de Charles River Laboratories (Calco, Italia). Los ratones se mantienen bajo condiciones sin patógenos específicos.

Inmunización de ratones: Los ratones se inmunizan i.p. con 10 µg de OVA (calidad V; Sigma-Aldrich) en 1 mg de hidróxido de aluminio (alumbre). Esta inmunización se repite después de 21 días (en los días 0 y 21). Los ratones de control reciben una inyección de solución salina en lugar de la disolución de OVA/alumbre. 26 días después de la inmunización, los ratones sensibilizados inhalan una disolución aerosolizada de 1 % de OVA disuelto en PBS durante 10 min. La inhalación de OVA se realiza durante 3 días en una fila (días 47, 48 y 49). Los ratones de control inhalan PBS solo bajo las mismas condiciones que se usan para el grupo experimental.

Inducción de tolerancia oral: Los ratones reciben LL-OVA, LL-pTREX1, 1 µg de OVA o BM9 en los días 0-4, 7-11, 14-18 y 21-25. Como control positivo para la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentan con 30 mg de OVA por catéter intragástrico que reduce la eosinofilia bronquial y la hiperreactividad de las vías respiratorias, siendo la alimentación a altas dosis más eficaz que la alimentación a bajas dosis.

Medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias (HVR): 24 h después de la inhalación final (día 50), la hiperreactividad de las vías respiratorias se evalúa por obstrucción del flujo de aire inducido por metacolina. Los ratones

se exponen durante 2,5 min a solución salina fisiológica nebulizada (Otsuka Pharmaceutical), seguido de 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 promedia aproximadamente cada 5 s, y los valores acumulados se promedian como el valor de Penh para cada momento de tiempo. La hiperreactividad de las vías respiratorias se expresa como PC200Mch (concentración estimulante al 200 % de metacolina), que es la concentración de metacolina que dobla el valor de Penh inicial.

Análisis de fluido de lavado broncoalveolar (BALF): Después de la medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias se obtienen muestras de lavado broncoalveolar. Los ratones se sacrifican mediante inyección i.p. de sobredosis de ketamina y xilazina y luego se lavan los pulmones con 0,5 ml de solución salina cuatro veces. Se centrifuga el fluido de lavado y las células se resuspenden en 1 ml de solución salina con 1 % de BSA. 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 IgE total en suero e Ig específica para OVA: En el día 50 se obtienen muestras de sangre del seno retroorbital bajo anestesia. Después de que las muestras hubiesen coagulado completamente, se centrifugan, y se recoge el suero y se guarda a -80 °C hasta su uso. Se somete a ensayo la IgE total mediante ELISA usando Ab apareados (BD Pharmingen) según las instrucciones del fabricante. Para medir IgE, IgG1 e IgG2a específica para OVA en sueros, placas de microtitulación (Maxisorp, Nunc, VWR International, Haasrode, Bélgica) se recubren con 2 µg/ml de OVA. Posteriormente, los pocillos se bloquean con 0,1 % de caseína en PBS, después de lo cual las placas se incuban con muestras de suero de ratón diluido de 1:10 a 1:20480 en PBS que contenía 0,1 % de caseína y 0,05 % de Tween 20 (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). Después de lavar se añade el sustrato [reactivo de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), Pharmingen, Becton Dickinson, Erembodegem, Bélgica] a cada pocillo. Finalmente, las reacciones se detienen añadiendo H₂SO₄ 1 M a los pocillos. Las absorbancias se leen a 450 nm. Las puntuaciones de ELISA se expresan como títulos, que son la inversa de la dilución más alta que tenía todavía una DO₄₅₀ superior al valor de punto de corte calculado. El punto de corte se calcula como la DO₄₅₀ media de 5 ratones no inmunizados aumentada con tres veces la DE.

Examen histológico de tejido pulmonar: Después obtener muestras de lavado broncoalveolar, los pulmones se perfunden con solución salina fisiológica y se extirpan de los ratones. Los pulmones se fijan con formalina tamponada neutralizada y se incorporan en parafina. Se tiñen secciones (3 µm de espesor) con H&E o ácido peryódico-Schiff (PAS). La intensidad de los cambios histológicos en los pulmones se evalúa 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 calciformes, 3) infiltración de células inflamatorias de los vasos en el área 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: Se extirpan los pulmones después de la perfusión con solución salina fisiológica y el ARN total se extrae usando ISOGEN (Nippon Gene) según las instrucciones del fabricante. El ARN total (10 µg) se transcribe de manera inversa usando cebador de oligo (dT) 15 (Promega) y RNasa H-Superscript II-transcriptasa inversa (Invitrogen Technologies) a 42 °C durante 2 h. Para garantizar que cada muestra contenía la misma cantidad de ADNc, la concentración de ADNc de β-actina de cada muestra se determina en primer lugar usando cebadores específicos para β-actina. Estas muestras se amplifican 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. Los productos de PCR se someten a electroforesis 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 de sentido directo para β-actina 5'-ACGACATGGAGAAGATCTGG-3' (SEQ ID N°: 19), y

el cebador de sentido contrario 5'-TCGTAGATGGGCACAGTGTG-3' (SEQ ID N°: 20).

El cebador de sentido directo para IL-13 5'-TCTTGCTTGCCTTGGTGGTCTCGC-3' (SEQ ID N°: 21) y de sentido contrario 5'-GATGGCATTGCAATTGGAGATGTTG-3' (SEQ ID N°: 22).

El cebador de sentido directo para eotaxina 5'-GGGCAGTAACCTCCATCTGTCTCC-3' (SEQ ID N°: 23) y el cebador de sentido contrario 5'-CACTTCTTCTTGGGGTCAGC-3' (SEQ ID N°: 24).

El cebador de sentido directo para IL-10 5'-TACCTGGTAGGAGTGATGCC-3' (SEQ ID N°: 25), y

el de sentido contrario 5'-GCATAGAAGCATAACATGATG-3' (SEQ ID N°: 26).

5 El cebador de sentido directo para IFN- γ 5'-CATAGATGTGGAAGAAAAGA-3' (SEQ ID N°: 27), y

el de sentido contrario 5'-TTGCTGAAGAAGGTAGTAAT-3' (SEQ ID N°: 28).

El cebador de sentido directo para TGF- β 5'-CTTTAGGAAGGACCTGGGTT-3' (SEQ ID N°: 29), y

el de sentido contrario 5'-CAGGAGCGACAATCATGTT-3' (SEQ ID N°: 30).

10 *Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas:* Un día después de la inhalación final (día 21), suspensiones de células individuales del bazo y ganglios linfáticos mediastínicos se preparan haciendo pasar las células a través de tamices celulares filtrantes de 70 μm (Becton/Dickinson Labware). Los eritrocitos se eliminan de las suspensiones de células de bazo por incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos. Los linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD4⁺CD25⁻ se enriquecen usando un kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ (Miltenyi Biotec, Alemania) o un kit de aislamiento de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente, y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).

15 Ensayos de proliferación de poblaciones de esplenocitos y de LN en masa, se cultivan 2×10^5 células en placas de fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 μl de medio completo tanto solo como con OVA purificada. Se añade OVA a concentraciones que oscilan de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Para los ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ y poblaciones de linfocitos T CD4⁺CD25⁻, 2×10^5 linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD4⁺CD25⁻ se cultivan en placas de fondo en U de 96 pocillos con esplenocitos tratados con mitomicina que se cargan con 1 mg/ml de OVA durante 16 h, que actúan de células presentadoras de antígeno, a relaciones de linfocitos T CD4⁺ o linfocitos 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. Después de 72 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con un 5% de CO₂, la proliferación se evalúa por la adición de 1 $\mu\text{Ci/pocillo}$ de [³H]-timidina. La radiactividad unida al ADN se recoge 18 h más tarde sobre esteras de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

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

30 *Ensayo de la actividad reguladora de T in vivo:* Un día después de la inhalación final (día 21), los bazos de los ratones tratados se digieren con 0,1 % de colagenasa (Sigma-Aldrich) a 37 °C durante 20 min. En algunos experimentos se preparan suspensiones de células individuales de células del bazo completas y se cultivan con Con A (2 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich) durante 48 h. Las células se recogen y 10^7 células se transfieren de manera adoptiva i.v. a ratones BALB/c sin tratamiento previo. Para la selección negativa, linfocitos CD4⁺, CD8⁺, CD11c⁺, CD19⁺ o CD11b⁺ se agotan de las células del bazo completas usando perlas magnéticas (MACS; Miltenyi Biotec) con mAb anti-CD4, CD8, CD11c, CD19 y CD11b de ratón biotinilado (BD Pharmingen), según las instrucciones del fabricante. La eficacia del agotamiento se examina por citometría de flujo (>99 %). Linfocitos CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ se purifican usando un kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ y un kit de aislamiento de linfocitos T reguladores siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprueba la pureza de las células positivamente seleccionadas usando citometría de flujo. Para los experimentos de transferencia de células, las células se transfieren 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 10^7 para células del bazo completas, células del bazo agotadas en una subpoblación o linfocitos CD4⁺ y linfocitos CD4⁺CD25⁻ positivamente seleccionados.

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

45 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 i.p. con CMSP de pacientes alérgicos a HDM y posteriormente expuestos a aerosoles de HDM producen IgE humana, desarrollan un infiltrado pulmonar compuesto por linfocitos T activados y DC y presentan HVR en respuesta a agentes broncoconstrictores (Pestel y col., 1994, J Immunol, 153:3804; Duez y col., Am J Respir Crit Care Med, vol. 161, pág. 200-206, 2000).

Bacterias

50 Se usa la cepa MG1363 de *L. lactis* en todo este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con 0,5 % de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se

almacenan a -20 °C en 50 % de glicerol en GM17. Para inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 200 veces en GM17 fresco y se incuban a 30 °C. Se alcanzó una densidad de saturación de 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en el plazo de 16 horas. Las bacterias se recogen por centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 µl de esta suspensión diariamente por catéter intragástrico.

5 Plásmidos

Der p 1, una glicoproteína globular de 222 residuos de aminoácido, es uno de los principales alérgenos de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt). Se sintetiza la secuencia de ADN con uso de codones de *L. lactis* óptimo que codifica la proteína Der p 1, se amplifica y se fusiona con la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina aguas abajo del promotor P1 lactocócico. Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que llevan ADNC de Der p 1 murina, Der p 1 aa 52-71 y Der p 1 aa 117-133 se designan LL-Derp1, LL-Derplaa52-71 y LL-Derp1aa117-133. LL-pT1 NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1 NX, sirve de control.

Cuantificación de Der p1

Der p 1 de LL-Derp1 se determina usando un ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA) específico para Der p 1 desarrollado internamente. También se evalúa la producción de proteínas recombinantes por análisis de transferencia Western.

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 de punción cutánea 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 superiores a 150 UI/ml (150-1600 UI/ml). Donantes sanos se someten a prueba como controles negativos (los niveles de IgE totales son inferiores a 150 UI/ml y tienen pruebas de punción cutánea negativas hacia alérgenos comúnmente inhalados).

Preparación de células mononucleares de sangre periférica humana

Se obtiene plasma rico en plaquetas después de la centrifugación (120 x g, 15 minutos) y se desecha. Entonces, los glóbulos sanguíneos se diluyen en RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, Escocia) (vol/vol) y se disponen en capas sobre un gradiente de Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Después de la centrifugación (400 x g, 30 minutos), las CMSP se recogen en la interfase y se lavan tres veces en medio RPMI estéril antes de la transferencia.

Ratones

Ratones C.B.- 17 SCID (6-8 semanas de edad) se mantienen en aisladores con lechos esterilizados en un animalario específico. Se comprueba regularmente la colonia SCID para determinar la ausencia de inmunoglobulinas de suero de ratón por ELISA.

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

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

Entorno experimental

Los ratones reciben *L. lactis* manipulado por ingeniería genética para expresar Der p 1 o un antígeno irrelevante (OVA) como control negativo.

Las bacterias *L. lactis* manipuladas por ingeniería genética se administran por vía oral a ratones SCID usando un catéter gástrico, usando diferentes intervalos y dosis de tratamiento comenzando un día después de la reconstitución con CMSP. La inducción de tolerancia oral se evalúa midiendo anticuerpos de IgE en suero humano, análisis de infiltración pulmonar, medición de HVR y análisis de poblaciones de células y producción de citocinas en el BALF. Además, se evalúa la inducción de tolerancia por análisis de la respuesta proliferativa de linfocitos T contra Der p 1.

Evaluación de la reactividad de las vías respiratorias (HVR)

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

Mediciones de IgE humana

5 Varios días después del trasplante con células humanas, se extrae sangre de los ratones del seno retroorbital bajo anestesia. Se investiga la IgE humana total por un procedimiento inmunoradiométrico de dos sitios con el uso de dos mAb 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 procedimiento permite la detección de 0,1 UI/ml (0,24 ng/ml).

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

Examen histológico del pulmón

20 Los pulmones se extirpan en el día 35 y se fijan en paraformaldehído y se procesan para su incorporación en parafina. Las secciones de tejido en parafina se tiñen para la detección de células CD45⁺ humanas, tras lo cual las células humanas se cuantificaron en las secciones de pulmón murino mediante puntuación histológica como se describe por Duez y col., 2000.

Análisis de fluido de lavado broncoalveolar (BALF)

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

Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas:

25 Se preparan suspensiones de células individuales de bazo haciendo pasar las células a través de tamices celulares filtrantes de 70 μ m (Becton/Dickinson Labware). Los eritrocitos se eliminan de las suspensiones de células del bazo por incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos. Los linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD4⁺CD25⁻ se enriquecen usando un kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ humanos (Miltenyi Biotec, Alemania) o un kit de aislamiento de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ humanos (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente, y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).

30 Ensayos de proliferación de esplenocitos en masa, 2 x 10⁵ células se cultivan en placas de fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 μ l de medio completo tanto solo como con Der p1 purificado, y tanto con como sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF- β . Se añade Der p1 a concentraciones que oscilan de 1 a 100 μ g/ml. Los anticuerpos neutralizantes se añaden a 1, 0,1 y 0,01 μ g/ml. Para los ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ humanos y poblaciones de linfocitos T CD4⁺CD25⁻ humanos, 2 x 10⁵ linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD4⁺CD25⁻ se cultivan en placas de fondo en U de 96 pocillos con CMSP humanas tratadas con mitomicina que se cargan con 1 mg/ml de Der p1 durante 16 h, que actúan de células presentadoras de antígeno, a relaciones de linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD4⁺CD25⁻/APC de 1/1, 1/0,3, 1/0,1, 1/0,03, 1/0 en un volumen total de 200 μ l de medio completo tanto con como sin anticuerpos neutralizantes. Después de 72 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂ se evalúa la proliferación por la adición de 1 μ Ci/pocillo de [³H]-timidina. La radiactividad unida al ADN se recoge 18 h más tarde sobre esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

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

Resultados

LL-OVA y LL-Der p 1 potencia significativamente la capacidad inductora de tolerancia en el modelo de OVA y de ratones huSCID para asma, respectivamente

50 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral tal como se ha descrito anteriormente (entorno experimental). La adición de LL-OVA/Derp1 potencia significativamente la inducción de tolerancia hacia OVA/Derp1 ya que la respuesta proliferativa específica para alérgeno de los esplenocitos se reduce significativamente en

el grupo de LL-OVA/Derp1 en comparación con los grupos de control y de OVA/Derp1 libre.

LL-OVA/Derp1 potencia la tolerancia oral en asociación con HVR reducida, infiltración eosinófila, niveles de IgE en suero y producción de citocinas IL-13, IL-4 e IL-5 reducida en respuesta a dicho alérgeno

5 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (*entorno experimental*). HVR, infiltración de BALF eosinófilo, título de IgE, además de producción de citocinas en respuesta a dichos antígenos, se determina como se ha descrito anteriormente. HVR, infiltración de BALF eosinófilo, título de IgE son fuertemente reducidos, e IL-13, IL-4 e IL-5 se redujeron significativamente en el grupo de LL-OVA/Derp1 en comparación con los grupos de control y de OVA/Derp1 libre.

LL-OVA/Derp1 potencia la tolerancia oral mediante linfocitos T CD4⁺

10 Para evaluar si los linfocitos T CD4 median o no en la inducción de la tolerancia oral, la respuesta de linfocitos T CD4 proliferativa específica para alérgeno se estudia en los esplenocitos y ganglios linfáticos. Por tanto, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (*entorno experimental*) y la proliferación de linfocitos T CD4⁺ específica para alérgeno se determina como se ha descrito en *Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas*. La respuesta de linfocitos T CD4 específica para alérgeno en el grupo de LL-OVA/Derp1 se reduce significativamente en
15 comparación con los grupos de control y de OVA/Derp1 libre.

Linfocitos T reguladores inducidos por antígeno tras la terapia con LL-OVA pueden transferir protección de respuestas similares a asma *in vivo*

20 Con el fin de probar la supresión activa de respuestas similares a asma en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, los presentes inventores transfieren adoptivamente esplenocitos de los diferentes grupos tratados como se ha descrito anteriormente (*ensayo de actividad reguladora de T in vivo*). En comparación con los controles y grupos de OVA libre, las respuestas similares a asma se reducen significativamente en el grupo de LL-OVA, que indica activación de linfocitos T CD4⁺ reguladores en el protocolo de tolerancia oral de combinación de los presentes inventores.

Conclusión

25 Los datos de los presentes inventores demuestran que la administración a través de la mucosa de *L. lactis* que secreta alérgeno es más potente que el alérgeno libre para inducir tolerancia inmunitaria específica para alérgeno mediante la inducción de linfocitos T reguladores CD4⁺ específicos para antígeno, incluso en el entorno de hiperreactividad establecida.

EJEMPLO E: Inducción de tolerancia al alérgeno alimentario BLG tras la administración por vía oral de *L. lactis* que secreta dicho alérgeno

30 Introducción

La alergia alimentaria es una enfermedad que afecta a aproximadamente del 2 % al 5 % de la población. En seres humanos, anticuerpos de IgE elevados, además de la presencia de linfocitos T específicos para antígeno productores de IL-4, sugieren un mecanismo desviado hacia Th2. Aquí, los presentes inventores demuestran que la administración oral de un alérgeno alimentario por *L. lactis* suprime respuestas inmunitarias específicas para alérgeno mediante la inducción
35 de linfocitos T reguladores CD4⁺ específicos para antígeno.

Material y procedimientos para los ejemplos

Bacterias y plásmidos

40 Se usa la cepa MG1363 de *L. lactis* en todo este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con 0,5 % de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se almacenan a -20 °C en 50 % de glicerol en GM17. Para inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 200 veces en GM17 fresco 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. Las bacterias se recogen por centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 µl de esta suspensión diariamente por catéter intragástrico. Se amplifica ADNc de β-lactoglobulina bovina y se fusiona con la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a
45 eritromicina, aguas abajo del promotor P1 lactocócico.

Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que llevan BLG murina se designan LL-BLG. LL-pT1 NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1 NX, sirve de control.

Cuantificación de β-lactoglobulina bovina (BLG)

Se determina BLG de LL-BLG usando un ensayo inmunoanalítico de adsorción (ELISA) específico para BLG desarrollado

internamente y análisis de transferencia Western.

Entorno experimental

5 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 como se describe por Frossard y col. (J Allergy Clin Immunol 113:958-964, 2004). Los ratones reciben LL-BLG o un antígeno irrelevante (OVA) como control negativo. 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 a BLG.

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

15 Para evaluar si la inducción de tolerancia inmunitaria hacia BLG podría potenciarse o no por *L. lactis*, los ratones se administran con LL-BLG o con 1 µg de BLG libre.

Sensibilización oral a BLG

20 Ratones C3H/HeOuJ hembra de cuatro a 5 semanas de edad (Charles River) se inmunizan en los días 0, 7, 14 y 21 por sonda nasogástrica intragástrica con 20 mg de BLG (Sigma) y 10 µg de CTX, comprados de List Biological Laboratories en 0,2 mol/l de NaHCO₃. El grupo de control positivo (ratones tolerizados) recibe 0,8 mg/ml de BLG 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, un grupo de ratones tolerizados se inyecta dos veces con 80 µg de BLG i.p. adsorbida a 1 de alumbre en los días 28 y 42.

Exposición a antígeno

30 En el día 28, todos los ratones se exponen por sonda nasogástrica intragástrica a 100 mg de BLG en 0,4 ml de 0,2 moles de NaHCO₃. 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 y col., 2001). La temperatura corporal central se mide por infrarrojos en la oreja antes de la exposición y 30 minutos después de la sonda nasogástrica. Los animales se sacrifican y la sangre se recoge por punción cardíaca en tubos que contienen EDTA, y el plasma se obtiene para la medición de histamina por un kit de ELISA comercial (Immunotech, Marsella, Francia).

Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas

35 Se preparan suspensiones de células individuales del bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y PP como se describe por Frossard y col. (2004). Los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T CD4⁺CD25⁻ se enriquecen usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ (Miltenyi Biotec, Alemania) o el kit de aislamiento de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente, y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).

40 Ensayos de proliferación de poblaciones de esplenocitos en masa y de LN, 2 x 10⁵ células se cultivan en placas de fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 µl de medio completo tanto solo como con BLG purificada, y tanto con como sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF-β. Se añade BLG a concentraciones que oscilan de 1 a 100 µg/ml. Los anticuerpos neutralizantes se añaden a 1, 0,1 y 0,01 µg/ml. Para los ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ y poblaciones de linfocitos T CD4⁺CD25⁻, 2 x 10⁵ células de linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD4⁺CD25⁻ se cultivan en placas de fondo en U de 96 pocillos con esplenocitos tratados con mitomicina que se cargan con 1 mg/ml de BLG durante 16 h, que actúan de células presentadoras de antígeno, a relaciones de linfocito T CD4⁺ o linfocito T CD4⁺CD25⁻/APC 1/1, 1/0,3, 1/0,1, 1/0,03, 1/0 en un volumen total de 200 µl de medio completo tanto con como sin anticuerpos neutralizantes. Después de 72 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂, la proliferación se evalúa mediante la adición de 1 µCi/pocillo de [³H]-timidina. La radiactividad unida al ADN se recoge 18 h después sobre esteras de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, USA) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

50 Para medidas de citocinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación se recogen después de 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelan a -80 °C hasta que se realiza el análisis de citocinas. La producción de citocinas se cuantifica usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences,

Mountain View, CA, EE.UU.).

Ensayo de actividad reguladora de T in vivo

5 Con el fin de probar la supresión activa de la formación de anticuerpos en ratones, esplenocitos, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD4⁺CD25⁻ o CD4⁺CD25⁺ purificados en perlas aisladas de los diferentes grupos experimentales tratados con *L. lactis* se transfieren adoptivamente a ratones C3H/HeOuj sin tratamiento previo. Se usan ratones sin tratar como control. El número de células transfectadas es 10⁷ para células completas del bazo, células del bazo agotadas en subpoblaciones o células CD4⁺ positivamente seleccionadas y linfocitos T CD4⁺CD25⁻ y CD4⁺CD25⁺. Si participan Treg, tras la exposición de estos ratones al antígeno BLG deben prevenir la inducción de respuestas inmunitarias humorales contra BLG y anafilaxia.

10 *Enzimoinmunoanálisis de adsorción 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 1 % de SBF (Life Technologies) complementado con pepstatina 1:1000 (Fluka) a 0,1 mg/ml. Las muestras se disgregan mecánicamente y se agitan con vórtex durante 2 minutos, seguido de dos centrifugaciones a 4 °C durante 20 minutos a 14.000 rpm.

15 Los sueros y las heces se ensayan para niveles de anticuerpo IgE, IgG1, IgG2a y/o IgA específico para BLG mediante un procedimiento adaptado de Adel-Patient y col., (2000, J. Immunol Methods). En resumen, placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc) se recubren durante 18 horas a temperatura ambiente con 250 ng/pocillo de estreptavidina (Fluka), seguido de 300 µl de una disolución de polivinilpirrolidona K25 (Fluka) durante la noche. Un microgramo de BLG biotilada se incuba durante 3 horas y se añaden sueros (1:6666 y 1:2222 para IgG1, 1:666 y 1:222 para IgG2a, 1:66 y 20 1:22 para IgE) o heces (1:3, 1:10 y 1:33) en PBS más 10 % de suero de caballo por duplicado en presencia de 0,5 µg/ml de anticuerpos de cabra anti-IgA de ratón, de rata anti-IgG1 de ratón o anti-IgG2a de ratón marcados con peroxidasa (Southern Biotechnologies) durante 2 horas. Para la medición de IgE, un Ab de rata monoclonal anti-IgE de ratón (clon R35-72, BD Pharmingen) se añade seguido de Ab anti-rata acoplado a peroxidasa (Caltag). La densidad óptica se mide a 490 nm. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias, usándose sueros agrupados de ratones inmunizados con 25 BLG más alumbre como suero de referencia.

Producción de anticuerpos específicos para antígeno medida por medio de ELISPOT

Se extirpan mecánicamente placas de Peyer del intestino y se incuban durante 30 minutos en medio HBSS complementado con 5 mmoles de EDTA (Life Technologies). Similarmente, placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos se trituran suavemente y se filtran a través de un filtro de nailon de 70 µm. Se incuban previamente células del bazo durante 5 minutos en NH₄Cl tamponado con Tris para eliminar los glóbulos rojos. Los linfoblastos se aíslan en un 30 gradiente del 60%/66% de Percoll (Amersham).

Para la medición de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgA específicos para BLG, placas de ELISPOT (Millipore) se recubren con estreptavidina durante la noche a 37 °C, seguido de la adición de 1 g de BLG biotilada durante 3 horas. Los linfoblastos se aíslan en un gradiente del 60%/66% de Percoll y se resuspenden a dos concentraciones diferentes, 1 y 2 x 10⁶ en 35 medio de Dulbecco modificado por Iscove complementado con penicilina, estreptomycin, L-glutamina, gentamicina, polimixina B y 5 % de SBF durante 24 horas a 37 °C, seguido de 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 las manchas se cuentan automáticamente usando el software KS ELISPOT 4.2.1 (Zeiss) y se expresan como unidades formadoras de células por 10⁶ células (UFC).

40 LL-BLG potencia significativamente la capacidad inductora de tolerancia de BLG en el modelo murino de alergia alimentaria

Para estudiar la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (entorno experimental). La adición de LL-BLG potencia significativamente la inducción de tolerancia hacia BLG ya que la 45 respuesta proliferativa específica para alérgeno de los esplenocitos se reduce significativamente en el grupo de LL-BLG en comparación con los grupos de control y de BLG libre.

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

Para estudiar la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (entorno experimental). La respuesta de anticuerpos específicos para BLG y la producción de citocinas en respuesta a 50 dicho factor se determinan como se ha descrito anteriormente. Los niveles de anticuerpos específicos para BLG e IL-4 disminuyen significativamente en el grupo de LL-BLG en comparación con los grupos de control y de BLG libre.

Resultados

LL-BLG potencia la tolerancia oral mediante linfocitos T CD4⁺

Para evaluar si los linfocitos T CD4 median o no en la inducción de la tolerancia oral, la respuesta de linfocitos T CD4 proliferativa específica para alérgeno se estudia en los esplenocitos y ganglios linfáticos. Por tanto, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (*entorno experimental*) y la proliferación de linfocitos T CD4⁺ específica para alérgeno se determina como se describe en *Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citocinas*. La respuesta de linfocitos T CD4 específica para alérgeno en el grupo de LL-BLG se reduce significativamente en comparación con los grupos de control y de BLG libre.

Linfocitos T reguladores inducidos por antígenos tras la terapia con LL-BLG pueden transferir protección de respuestas similares a alérgicas *in vivo*

Con el fin de probar la supresión activa de respuestas similares a alérgicas en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, los presentes inventores transfieren adoptivamente esplenocitos de los diferentes grupos tratados como se ha descrito anteriormente (*Ensayo de actividad reguladora de T in vivo*). En comparación con controles y grupos de BLG libre, las respuestas similares a alérgicas se reducen significativamente en el grupo de LL-BLG, que indica activación de linfocitos T reguladores CD4⁺ en el protocolo de tolerancia oral de combinación de los presentes inventores.

15 Conclusión

Los datos de los presentes inventores demuestran que la administración a través de la mucosa de *L. lactis* que secreta alérgeno es más potente que el alérgeno libre en inducir tolerancia inmunitaria específica para alérgeno mediante la inducción de linfocitos T reguladores CD4⁺ específicos para antígeno.

20 EJEMPLO F: Inducción de tolerancia a insulina tras la administración por vía oral de *L. lactis* que secreta dicho autoantígeno

Introducción

La autoinmunidad se caracteriza por lesión tisular inflamatoria espontánea y por función fisiológica alterada resultante de la pérdida de tolerancia a un antígeno propio. Está asociada a un sistema inmunitario parcialmente hiperactivo, que se caracteriza por un exceso de linfocitos T cooperadores (Th). Es difícil influir en los factores 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 linfocitos T inmunorreguladores reduciendo las primeras y/o potenciando los últimos. 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.

Aquí, los presentes inventores demuestran que la administración oral de un autoantígeno que libera *L. lactis* suprime respuestas inmunitarias específicas para diabéticos mediante la inducción de linfocitos T reguladores CD4⁺ específicos para antígeno.

Material y procedimientos

35 Bacterias y plásmidos

Se usa la cepa MG1363 de *L. lactis* en todo este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM17, es decir, M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) complementado con 0,5 % de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se almacenan a -20 °C en 50 % de glicerol en GM17. Para inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 200 veces en GM17 fresco 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. Las bacterias se recogen por centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 µl de esta suspensión diariamente por catéter intragástrico.

Se sintetizan secuencia de ADN con uso de codones de *L. lactis* óptimo que codifica péptido B24-C36 de proinsulina II humana (hpIIP), insulina porcina y péptido 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 con la señal de secreción Usp45 del vector pT1NX resistente a eritromicina, aguas abajo del promotor P1 lactocócico.

Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que llevan hpIIP murina, insulina, InsB₉₋₂₃ se designan LL-hpIIP, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃, LL-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1NX, sirvió de control. La expresión de estas proteínas se determina usando ELISA específico para antígeno y análisis de transferencia Western.

Ratones

Se compran ratones diabéticos macho y hembra no obesos (NOD) y ratones NOD con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (antecedentes Balb/c) de Jackson laboratory. Se compran ratones naturales (WT) Balb/c de Charles River Italy. Los ratones se mantienen en un animalario central sin patógenos específicos. Los ratones se tratan y se usan según las directrices institucionales.

5 *Entorno experimental*

En un entorno profiláctico, LL-hplp, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃ se administran por vía oral a ratones NOD comenzando a partir del día 21 de edad (destete) y usando la pauta de alimentación óptima o hasta los 100 días de edad (cuando la mayoría de los ratones desarrollan diabetes). Además, LL-pT1NX se administra por vía oral como control negativo. Para el grupo de control positivo (tolerizante), ratones NOD de 3 semanas de edad se tratan por vía oral con 0,8 mg de insulina/hplp/InsB₉₋₂₃ humana durante 3 veces a la semana durante 2 ó 4 semanas. El desarrollo de diabetes se determina por 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. Los páncreas se recogen a las 12-23 semanas y al final del experimento (35 semanas) y las secciones en serie se tiñen con hematoxilina/eosina para puntuar la infiltración de células mononucleares o por inmunohistoquímica para analizar la infiltración de linfocitos T.

15 En un entorno terapéutico, LL-hplp, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃ se administran por vía oral a hembras NOD diabéticas que muestran glucosuria e hiperglucemia estable (12-23 semanas). Además, LL-pT1NX se administra por vía oral como control negativo. Para el grupo de control positivo (tolerizante), ratones NOD diabéticos se tratan como se describe en Bresson y col., 2006. Se define la remisión completa como la desaparición de la glucosuria y el regreso a una glucemia normal.

20 En un entorno de *trasplante* de islotes singénicos, ratones NOD hembra con diabetes de aparición reciente se tratan por vía oral durante 3 semanas con LL-hplp, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃ o con LL-pT1 NX como control negativo. Después de 3 semanas, 500 islotes pancreáticos recientemente aislados de ratones NOD no diabéticos se trasplantan a ratones NOD diabéticos. Entonces, la glucosa en sangre se monitoriza 3 veces semanalmente hasta la reaparición de diabetes o hasta 15 semanas después del injerto. Los animales con 2 niveles de glucosa consecutivos ≥ 250 mg/dl se consideran diabéticos y posteriormente se sacrificarán para la recogida de suero y análisis histológico del injerto.

Los mecanismos precisos de inducción de tolerancia se analizan *in vitro*, *in vivo* después de reexponer los ratones NOD a autoantígenos específicos y por transferencia adoptiva de linfocitos T a ratones NOD-SCID.

Detección de diabetes:

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

35 *Insulinitis:* Los ratones se sacrifican por asfixia con CO₂ y el páncreas se fija en 10 % de formalina durante la noche, se incorpora en parafina y secciones de 5 μ m en serie se tiñen con hematoxilina y eosina. La puntuación de insulinitis (media \pm DE) se determina clasificando microscópicamente el grado de infiltración celular en 10-15 islotes/ratón del siguiente modo: 0, sin signos visibles de infiltración de islotes; 1, infiltración peri-islotes; 2, < 50 % de infiltración; 3, > 50 % de infiltración.

40 *Aislamiento y trasplante de islotes:* Los islotes de ratones NOD donantes de 14 a 21 días de edad sin insulinitis y diabetes se aíslan después de la eliminación aséptica digiriendo las glándulas pancreáticas con colagenasa en solución salina equilibrada con Hanks durante agitación vigorosa. El aislamiento de islotes se lleva a cabo mediante selección a mano directa bajo un estereomicroscopio. Los ratones NOD receptores diabéticos se anestesiaron por inyección intraperitoneal de avertina (0,02 ml/g BWT), el riñón izquierdo se expuso mediante incisión lumbar y 500 islotes recientemente aislados se administraron bajo la cápsula renal.

Inmunohistoquímica

45 Para detectar insulina, la expresión de CD4 y CD8 en células β pancreáticas, Ab primarios (de cobaya anti-insulina porcina de Dako [dilución 1:300], RM4.5 anti-CD4 e IHC anti-CD8a de BD Biosciences [dilución 1:50]) se aplican a secciones de tejido congeladas como se describe en Christen y col., 2004.

Ensayo de proliferación in vitro

50 Se preparan suspensiones de células individuales del bazo, LN mesentéricos (MLN) y PLN. Ensayos de proliferación de poblaciones de esplenocitos totales, 2×10^5 células se cultivan en placas de fondo en U de 96 pocillos en un volumen total de 200 μ l de medio completo tanto solo como con concentraciones graduadas (1-100 μ g/ml) de insulina humana purificada o péptidos específicos para linfocitos T CD4 (InsB₉₋₂₃, restringido por H-2^d^o⁹) o para linfocitos T CD8 T (InsB₁₅₋₂₃, restringido por K^d) (Sigma), y tanto con como sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF- β . Los anticuerpos neutralizantes se añaden a 1, 0,1 y 0,01 μ g/ml. Para los ensayos de proliferación de linfocitos T CD3⁺ totales,

linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y poblaciones de linfocitos T CD4⁺CD25⁻, 0,2 x 10⁵ células de linfocitos T se cultivan en placas de fondo en U de 96 pocillos con 1 x 10⁵ esplenocitos irradiados de ratones Balb/c WT cargados con insulina o GAD65 o péptidos específicos para linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, en un volumen total de 200 µl de medio completo tanto con como sin anticuerpos neutralizantes. Después de 72 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂, la proliferación se evalúa mediante la adición de 1 µCi/pocillo de [³H]-timidina. La radiactividad unida al ADN se recoge 16-18 h después sobre esteras de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer). Los linfocitos T se purifican a partir de PLN o bazos por selección negativa a través de separación de perlas magnéticas usando el kit de aislamiento de CD3⁺, CD4⁺ o CD8⁺ (MACS; Milteny Biotec, Auburn, CA). Los linfocitos T CD4⁺ se usan como células totales o se separan adicionalmente en CD25⁺ y CD25⁻ por MACS usando el kit de aislamiento de CD25⁺ (Milteny Biotec). La pureza (> 90 %) de las poblaciones de células se determina por análisis de citometría de flujo.

Para medidas de citocinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares usados en los diferentes ensayos de proliferación (estimulación específica para antígeno), descritos anteriormente, se recogen después de 72 h de cultivo y se congelan a -80 °C hasta que se realiza el análisis de citocinas. La producción de citocinas se cuantifica usando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.). Linfocitos T CD3⁺, T CD4⁺ o linfocitos T CD8⁺ purificados se cultivan y se estimulan *in vitro* no específicamente con una mezcla de anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/ml de cada uno) durante 24 horas o permanecen sin estimular como control. Los sobrenadantes se recogen y se analizan para la producción de IL-10, IL-4, IL-5 y IFN-γ usando BD™ Cytometric Bead Array flex set en un bioanalizador BD FACSAarray 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).

Ensayo de inhibición de la proliferación de linfocitos T in vitro

2 x 10⁴ linfocitos T CD4⁺CD25⁻ esplénicos totales purificados aislados de ratones NOD hembra recientemente diabéticos (8-12 semanas) se co-cultivan con números variables de linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y poblaciones de linfocitos T CD4⁺CD25⁻ aisladas del bazo, MLN o PLN de los diferentes grupos experimentales en presencia de 2 x 10⁴ esplenocitos cargados con insulina o péptidos irradiados reducidos en linfocitos T de ratones Balb/c WT. Después de 72 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂, la proliferación se evalúa mediante la adición de 1 µCi/pocillo de [³H]-timidina. La radiactividad unida al ADN se recoge 16-18 h después sobre esteras de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

Ensayo de citotoxicidad in vitro

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, U.K) durante 90 min a 37 °C, se lavan tres veces y luego se incuban con 1 µg/ml de péptido (InsB₁₅₋₂₃ o un péptido irrelevante) a 37 °C durante 1 h. Las células diana se lavan dos veces y se siembran a 10⁴ células por pocillo. Linfocitos T CD8⁺, aislados de bazo, MLN y PLN, se añaden a cada pocillo, por triplicado, a diversas relaciones de efector:diana (E : D). Las placas se centrifugan a 500 rpm durante 2 min y se incuban a 37 °C durante 4 h. Después de la incubación, los sobrenadantes se recogen 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, linfocitos T CD8⁺ se incuban con 5 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (clon 145-2C11, Pharmingen) antes de la incubación con efectores.

Transferencia adoptiva de diabetes

Ratones NOD-SCID a las 8-10 semanas se inyectan i.v. con 2 x 10⁷ o i.p. con 5 x 10⁶ esplenocitos aislados de ratones NOD hembra diabéticos (6 semanas, 12 semanas y 18 semanas) combinados con o sin números graduados de linfocitos T CD3⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD4⁺CD25⁻ o CD4⁺CD25⁺ purificados en perlas aislados de los diferentes grupos experimentales tratados con *L. lactis*. Se usan ratones sin tratar como control. El desarrollo de diabetes se determina por monitorización continua de los niveles de glucosa en sangre tres veces a la semana.

Resultados

LL-hpllp, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃ retrasa la reaparición de diabetes después del trasplante de islotes singénicos

Para evaluar si LL-hpllp, LL-Insulina y LL-InsB(9-23) inducen o no tolerancia oral se estudia la reaparición de diabetes después del trasplante de islotes singénicos. Por tanto, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (*entorno experimental*) y los islotes pancreáticos se trasplantan como se ha descrito (*Aislamiento y trasplante de islotes*). La reaparición de diabetes se retrasa en el grupo de LL-hpllp/insulina/insB₉₋₂₃ en comparación con el control.

LL-hpllp, LL-insulina o LL-InsB₉₋₂₃ potencian significativamente la capacidad inductora de tolerancia de hpllp, insulina o InsB₉₋₂₃ libres en el ratón diabético no obeso

5 Para estudiar la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (entorno experimental). La adición de LL-hp1lp, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃ potencia significativamente la inducción de tolerancia hacia el autoantígeno ya que la respuesta proliferativa específica para autoantígeno de los esplenocitos se reduce significativamente en el grupo de LL-hp1lp/insulina/InsB₉₋₂₃ en comparación con los grupos de control y de hp1lp/insulina/InsB₉₋₂₃ libre.

10 LL-hp1lp, LL-insulina o LL-InsB₉₋₂₃ potencian la tolerancia oral en asociación con reducción de insulinitis, disminución de la tasa de destrucción de células beta y aumento de la producción de IL-10 por esplenocitos. Para estudiar la inducción de tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (*entorno experimental*). La presencia de insulinitis, la tasa de destrucción de células beta y la producción de citocinas en respuesta a dicho autoantígeno se determina como se ha descrito anteriormente. El análisis histológico muestra un grado de insulinitis significativo menor y destrucción de células beta y elevada producción de IL-10 en el grupo de LL-hp1lp/insulina/InsB₉₋₂₃ en comparación con los grupos de control y hp1lp/insulina/InsB₉₋₂₃ libre.

LL-hp1lp, LL-insulina, LL-InsB₉₋₂₃ potencia la tolerancia oral mediante linfocitos T CD4⁺

15 Para evaluar si los linfocitos T CD4 median o no en la inducción de tolerancia oral, la respuesta de linfocitos T CD4 proliferativa específicos para autoantígeno se estudia en los esplenocitos y ganglios linfáticos. Por tanto, los ratones se alimentan por vía oral como se ha descrito anteriormente (*entorno experimental*) y la proliferación de linfocitos T CD4⁺ específicos para autoantígeno se determina como se ha descrito (*ensayo de proliferación in vitro*). La respuesta de linfocitos T CD4 específicos para autoantígeno en el grupo de LL-hp1lp/insulina/InsB₉₋₂₃ en comparación con los grupos de control y hp1lp/insulina/InsB₉₋₂₃ libre.

20 Ejemplo F5: Las respuestas de CD8⁺ autoagresivas se suprimen en ratones NOD tras la terapia con LL-InsB₉₋₂₃

Para examinar si este enfoque de combinación de los presentes inventores induce o no linfocitos T CD4⁺ supresores que pueden modular la diabetes por mecanismos supresores circunstanciales, los presentes inventores analizan el efecto sobre linfocitos T autoagresivos CD8⁺. El porcentaje y/o actividad de linfocitos CD8⁺ autoagresivos específicos para antígeno se reduce fuertemente después de la terapia con LL-InsB₉₋₂₃.

25 Los linfocitos T reguladores inducidos por antígenos tras la terapia con LL-InsB₉₋₂₃ pueden transferir protección de respuestas similares a autoinmunitarias *in vivo*

30 Con el fin de probar la supresión activa de respuestas similares a diabéticas en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, los presentes inventores transfieren adoptivamente esplenocitos de los diferentes grupos tratados como se ha descrito anteriormente (transferencia adoptiva de diabetes). En comparación con controles y el grupo de InsB₉₋₂₃ libre, respuestas similares a diabéticas se reducen significativamente en el grupo de LL-InsB₉₋₂₃, que indica activación de linfocitos T reguladores CD4⁺ en el protocolo de tolerancia oral de combinación de los presentes inventores.

Conclusión

35 Los presentes inventores demuestran que la administración oral de *L. lactis* que libera autoantígeno suprime respuestas inmunitarias específicas para diabéticos mediante la inducción de linfocitos T reguladores CD4⁺ específicos para antígeno.

DISCUSIÓN

40 En su conjunto, los datos anteriormente presentados indican que la suplementación oral de *L. lactis* genéticamente modificado que secreta antígenos pueden disminuir la inflamación sistémica inducida por ese antígeno, incluso en un sujeto sensibilizado. Ventajosamente, la supresión mediada por *Lactococcus* frecuentemente parece más potente que después de la administración a través de la mucosa de antígeno libre. Posiblemente, la supresión puede medirse por la inducción de linfocitos T reguladores *Foxp3*⁺.

REFERENCIAS

- 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.
- 45 - Gasson, M. J. Plasmid complements of Streptococcus lactis NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J. Bacteriol. 154, 1-9 (1983).
- Liu y col., (2006) Engineered vaginal Lactobacillus strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor Cyanovirin-N. A.A.C. 50, 3250-3259.
- Marietta, E. y col. A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. J. Clin.

Invest 114, 1090-1097 (2004).

- 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.
- 5 - Mazzarella, G. y col. An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients. *Gut* 52, 57-62 (2003).
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J. and Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.* 115, 1923-1933.
- 10 - Steidler, L. y Rottiers, P. (2006) Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Ann N Y Acad. Sci.* 1072, 176-186.
- Strobel, S., Mowat, A.M., Drummond, H.E., Pickering, M.G. and 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.
- 15 - Tobagus, I.T., Thomas, W.R., & Holt, P.G. Adjuvant costimulation during secondary antigen challenge directs qualitative aspects of oral tolerance induction, particularly during the neonatal period. *J. Immunol.* 172, 2274-2285 (2004).
- Van Asseldonk, M. y col. Cloning of Usp45, A Gene Encoding A Secreted Protein from *Lactococcus-Lactis* Subsp *Lactis* Mg1363. *Gene* 95, 155-160 (1990).
- 20 - Waterfield, N.R., Lepage, R.W.F., Wilson, P.W., & Wells, J.M. The Isolation of *Lactococcal* Promoters and Their Use in Investigating Bacterial Luciferase Synthesis in *Lactococcus-Lactis*. *Gene* 165, 9-15 (1995).

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo que secreta constitutivamente un antígeno que participa en la inducción de la enfermedad celíaca para su uso en la administración a través de la mucosa para tratar la enfermedad celíaca, con la condición de que cuando el microorganismo que secreta constitutivamente dicho antígeno es *Lactococcus lactis* MG1363 que secreta la proteína alfa-gliadina, péptido de gliadina HLA-DQ8 o péptido de gliadina HLA-DQ8 en forma desamidada, entonces dicho microorganismo no es para ser administrado por vía oral en combinación con *Lactococcus lactis* MG1363 que produce IL-10 murina.
2. El microorganismo que secreta un antígeno para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho microorganismo es:
 - bacteria del ácido láctico o levadura, más preferentemente es *Lactococcus lactis* (LL);
 - se administra diariamente;
 - se administra durante al menos 1 semana, más preferentemente durante al menos 1 mes o 1 año;
 - se administra al menos una vez a día, preferentemente dos veces a día;
 - se administra en una dosis de al menos 10 femtogramos a 100 mg por día, tal como 100 fg a 10 mg por día, o 1 pg a 1 mg por día, o 10 pg a 100 µg por día, o 100 pg a 10 µg por día, o 1 ng a 1 µg por día, o 10 ng a 100 mg por día; y/o
 - se administra por spray, cápsula, aerosol, pastillas para chupar, bolo, comprimido, sobres, líquido, suspensión, emulsión o trociscos.
3. El microorganismo que secreta un antígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha administración a través de la mucosa se elige del grupo que consiste en administración rectal, administración bucal, administración pulmonar, administración ocular, administración nasal, administración vaginal y administración oral.
4. El microorganismo que secreta un antígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho microorganismo o composición se formula como un medicamento, alimento médico o producto nutricional.
5. Una composición farmacéutica que consiste en un microorganismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho microorganismo secreta constitutivamente un antígeno, que participa en la inducción de la enfermedad celíaca, con la condición de que cuando el microorganismo que secreta constitutivamente dicho antígeno es *Lactococcus lactis* MG1363 que secreta la proteína alfa-gliadina, péptido de gliadina HLA-DQ8 o péptido de gliadina HLA-DQ8 en forma desamidada, entonces dicho microorganismo es para ser administrado por vía oral en combinación con *Lactococcus lactis* MG1363 que produce IL-10 murina.
6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que dicho microorganismo es bacteria del ácido láctico o levadura, más preferentemente es *Lactococcus lactis* (LL).
7. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en la que dicho microorganismo está presente en una dosis de al menos 10 femtogramos a 100 mg, tal como 100 fg a 10 mg, o 1 pg a 1 mg, o 10 pg a 100 µg, o 100 pg a 10 µg, o 1 ng a 1 µg, o 10 ng a 100 mg.
8. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que dicha composición farmacéutica se formula en sprays, cápsulas, aerosoles, pastillas para chupar, bolo, comprimidos, sobres, líquidos, suspensiones, emulsiones o trociscos.
9. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso en la administración a través de la mucosa para tratar la enfermedad celíaca.
10. Medicamento, producto nutricional o alimento médico para tratar, prevenir y/o aliviar la enfermedad celíaca, que comprende al menos un microorganismo, en el que dicho microorganismo secreta constitutivamente un antígeno, que participa en la inducción de la enfermedad celíaca, con la condición de que cuando el microorganismo que secreta constitutivamente dicho antígeno es *Lactococcus lactis* MG1363 que secreta la proteína alfa-gliadina, péptido de gliadina HLA-DQ8 o péptido de gliadina HLA-DQ8 en forma desamidada, entonces dicho microorganismo no es para ser administrado por vía oral en combinación con *Lactococcus lactis* MG1363 que produce IL-10 murina.
11. Medicamento, producto nutricional o alimento médico según la reivindicación 10, en el que dicho microorganismo es bacteria del ácido láctico o levadura, más preferentemente es *Lactococcus lactis* (LL)

FIGURA 1

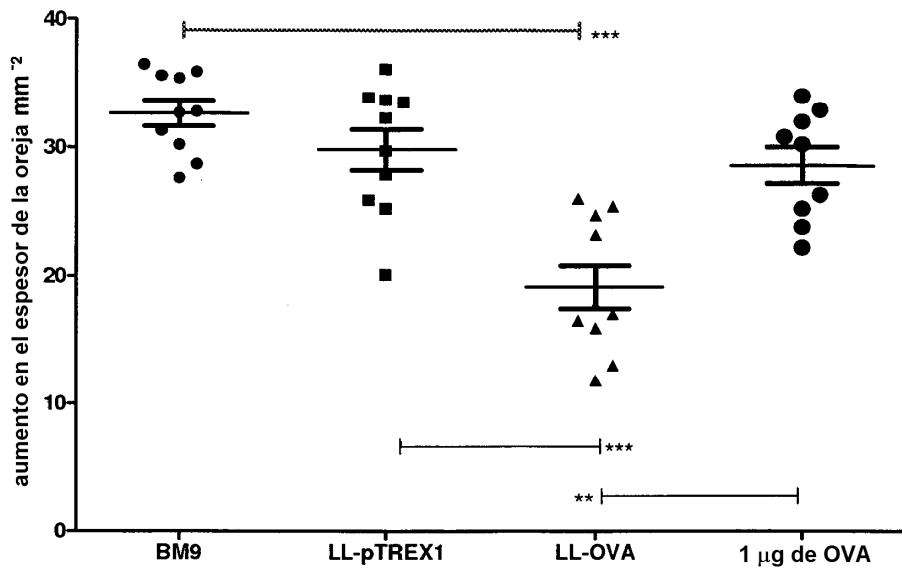
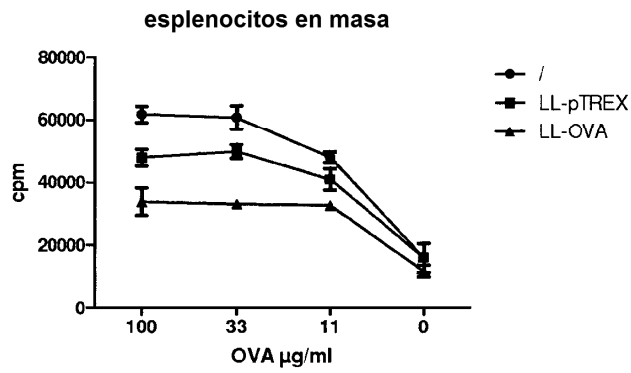
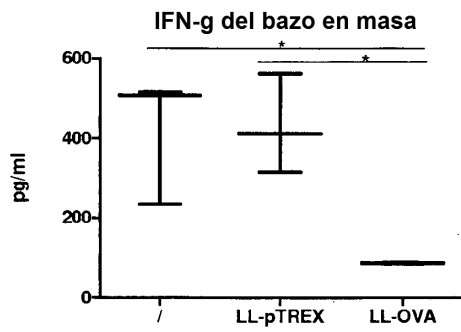


FIGURA 2

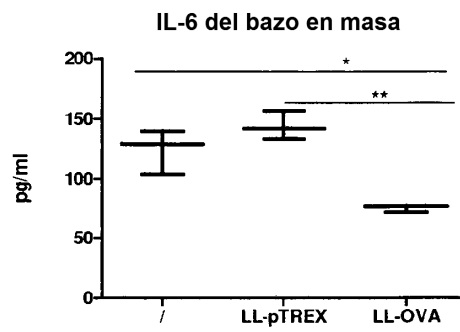
(A)



(B)



(C)



(D)

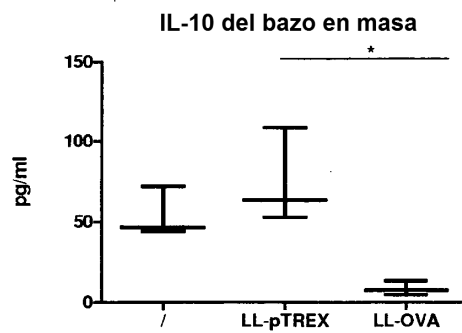


FIGURA 3

CD4⁺ DEL BAZO

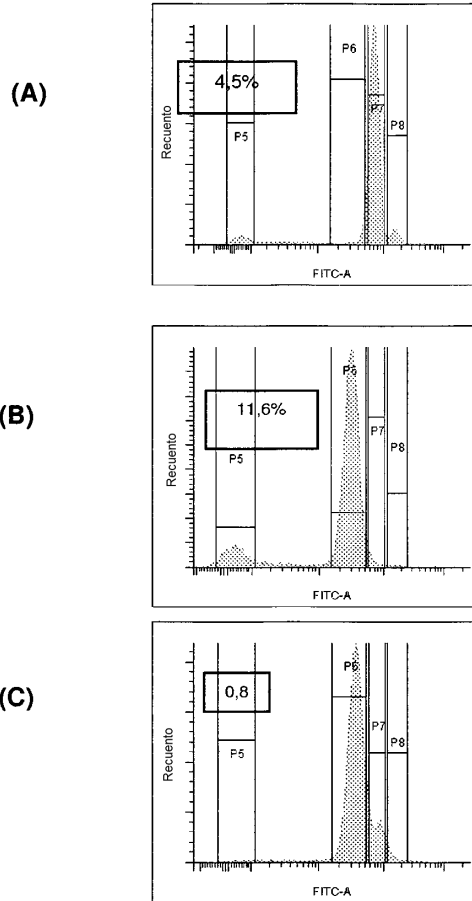


FIGURA 4

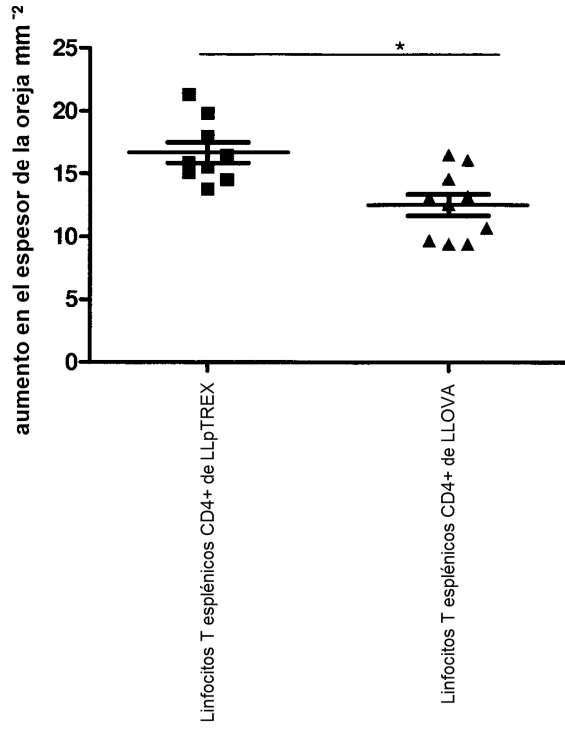


FIGURA 5

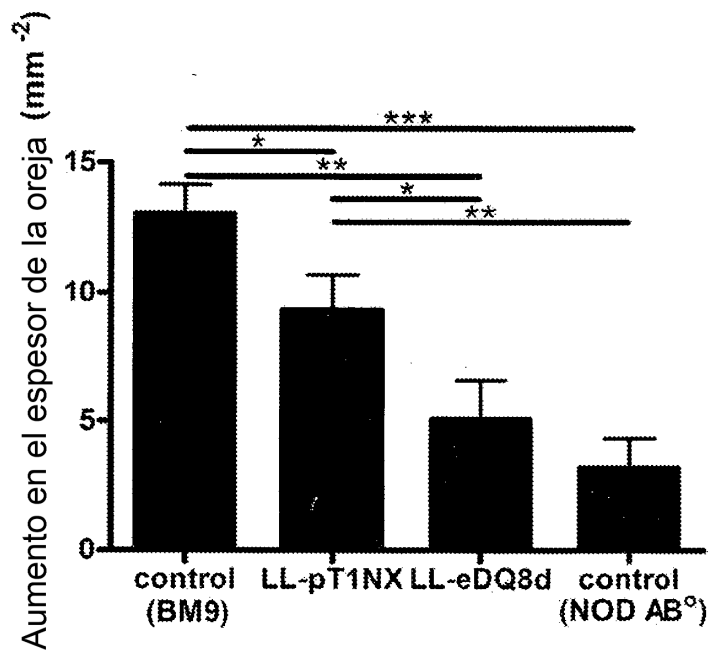


FIGURA 6

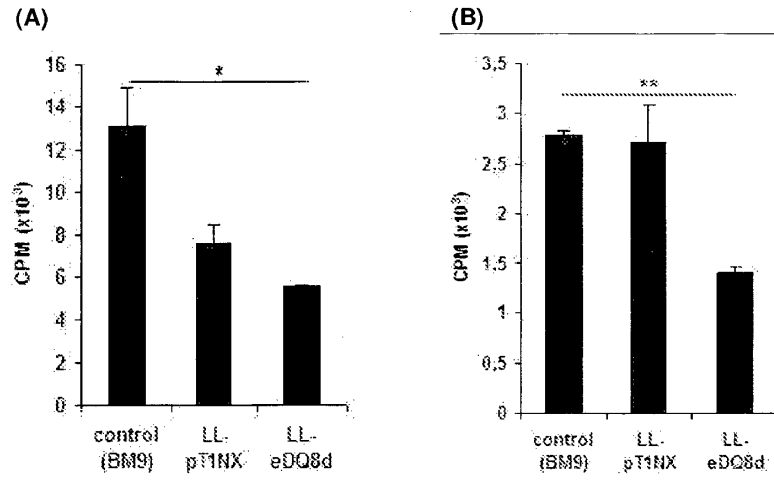
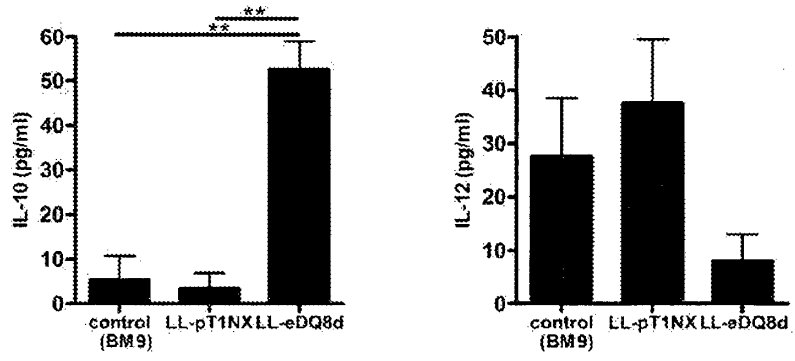


FIGURA 7

(A)



(B)

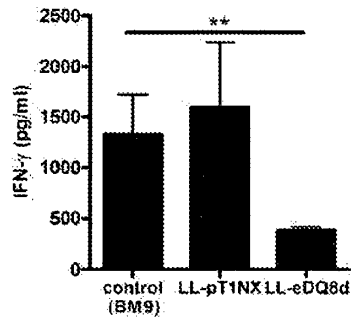


FIGURA 8

