

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 755**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**C07K 14/81** (2006.01)

**C12N 15/74** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2011 PCT/EP2011/050489**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO2011086172**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2011 E 11700274 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2451467**

54 Título: **Bacteria probiótica recombinante para la prevención y tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y del Síndrome del Intestino Irritable (SII)**

30 Prioridad:

**14.01.2010 EP 10305045**

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

**25.05.2017**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR;**

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE**

**AGRONOMIQUE (INRA) (25.0%);**

**INSTITUT PASTEUR (25.0%) y**

**UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (25.0%)**

72 Inventor/es:

**VERGNOLLE, NATHALIE;**

**SALLENAVE, JEAN-MICHEL;**

**LANGELLA, PHILIPPE y**

**BERMUDEZ-HUMARAN, LUIS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 613 755 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

Bacteria probiótica recombinante para la prevención y tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y del Síndrome del Intestino Irritable (SII)

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo general de la terapia de enfermedades intestinales inflamatorias tales como Enfermedades Inflamatorias Intestinales (EII), enfermedades pulmonares tales como fibrosis quística y enfermedades obstructivas bronco-pulmonares crónicas (EPOC), enfermedad articular inflamatoria (tal como osteoartritis), enfermedad urogenital inflamatoria, y enfermedades asociadas con síntomas de dolor visceral crónico, tal como el Síndrome del Intestino Irritable (SII).

### 10 Antecedentes de la técnica

El tratamiento de los trastornos inflamatorios crónicos tales como EII representa un importante desafío médico ya que afectan a varios millones de personas. Esta gran incidencia está en países desarrollados y ha aumentado de forma constante a lo largo de las últimas 3 décadas. En la actualidad se necesitan mejorar encarecidamente las terapias para las EII, un gran porcentaje de pacientes (entre 20 y 40%) son resistentes a cualquiera de las formas de los tratamientos, estando también los fármacos actualmente disponibles (glucocorticoides y terapias con anticuerpos monoclonales) asociados a efectos secundarios graves y altos costes. Además, los mecanismos implicados en la patogénesis de las EII no se comprenden del todo, y el desarrollo de más tratamientos eficaces o incluso de curas para las EII dependen del mejor conocimiento de la regulación de la respuesta inflamatoria. Varios estudios han demostrado un papel crucial para las proteasas en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria crónica del tracto gastrointestinal (TGI) [Vergnolle, N. 2005.; Cenac, N. et al., 2007; Hyun, E., et al., 2008; Vergnolle, N., et al., 2004]. Por lo tanto, los inhibidores de la proteasa endógena parecen ser cruciales para el control de las respuestas inflamatorias intestinales.

En base a este conocimiento, los inventores proponen que la producción de estos inhibidores en el TGI, podrían usarse para el tratamiento de una EII y/o del síndrome del intestino irritable (SII).

25 El empleo de los probióticos para el tratamiento de las EII ya se ha propuesto durante varios años y diferentes estudios han presentado algunos efectos beneficiosos de estas bacterias probióticas ensayadas en solitario o en combinación [Hedin, C. et al., 2007; Sartor, R. B. 2004]. La estrategia de utilizar bacterias recombinantes de calidad alimentaria no-patógenas como vehículos de producción de moléculas anti-inflamatorias a nivel de la mucosa ya se ha utilizado para producir la citoquina IL-10 anti-inflamatoria [Steidler, L., et al., 2000]. Ensayos clínicos de Fase I han demostrado que la cepa de *Lactococcus lactis* que expresa la citoquina IL-10 proporcionada de forma oral, era segura y no aparecieron efectos secundarios graves en los pacientes [Baat, H., et al., 2006]. Sin embargo, la disminución de la actividad de la enfermedad en pacientes con la enfermedad de Crohn tratados con *L. lactis* recombinante IL-10 estaba limitada de alguna manera. Esta eficacia limitada se podría explicar mediante el hecho de que la producción de IL-10 se ha presentado siempre por tener sólo discretos efectos beneficiosos frente al desarrollo de la colitis [Baat, H., et al., 2003]. Una mejor elección en la naturaleza de la molécula anti-inflamatoria que se produce mediante *L. lactis*, podría mejorar considerablemente la eficacia del tratamiento. Aquí, los inventores proponen utilizar una bacteria de calidad alimentaria para expresar y producir una anti-proteasa trapina-2 en el intestino.

40 Sallenave et al., 2008 (Gastroenterología, Vol. 134, Nº 4, suppl. 1, página A259) divulga que la elafina es protectora contra el desarrollo de la colitis en un modelo murino de enfermedad inflamatoria intestinal.

### Compendio de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que el uso de una bacteria de calidad alimentaria para producir una molécula anti-inflamatoria tal como una trapina-2 proporciona una seguridad y una eficacia mejores que la de tratamientos existentes.

45 La invención se refiere a una Bacteria Ácido Láctica de calidad alimentaria que comprende un gen recombinante que se selecciona de un gen que codifica para la proteína trapina-2 (elafina) o una fracción activa de la proteína trapina-2 (elafina). Otro aspecto de la invención se refiere a una composición terapéutica que comprende una bacteria de calidad alimentaria como se define anteriormente.

50 La divulgación se refiere también a una molécula que se selecciona de la proteína trapina-2 o una fracción activa de la proteína trapina-2, un miembro de las proteínas de la familia WAP o una fracción activa de un miembro de proteínas de la familia WAP o un miembro de proteínas de la familia Serpina o una fracción activa de un miembro de las proteínas de la familia Serpina para el tratamiento del Síndrome del Intestino Irritable (SII).

### Descripción detallada de la invención

Definiciones

5 Como se emplea en la presente memoria, el término “trapina-2” (también conocido como elafina, inhibidor específico de elafina (ESI) o SKALP para la anti-leucoproteasa de la piel) de la familia WAP, indica un inhibidor de la HNE (elastasa de neutrófilos humana) de peso molecular bajo (9,9 kDa) y la proteinasa 3, que se secreta en el tracto respiratorio [Sallenave et al., 1991 y 1993]. Junto con (A1-Pi) y SLPI, la trapina-2 comprende una parte integral del ‘escudo anti-elastasa’ en el pulmón. Un ejemplo de una secuencia para el gen trapina-2 humano se encuentra en la base de datos Genbank bajo el número de acceso S58717.

Como se emplea en la presente memoria, el término “familia WAP” para “Proteína de Suero Ácida” indica una familia de proteínas que contienen la trapina-2, y el ps20.

10 Como se emplea en la presente memoria, el término “familia de Serpinas” para Inhibidores de Serina Proteasa indica una familia de inhibidores de serina proteasa que son similares en la secuencia aminoácida y en el mecanismo de inhibición, pero difieren en su especificidad hacia enzimas proteolíticas. Esta familia incluye la alfa 1-antitripsina (A1-Pi), angiotensinógeno, ovoalbúmina, antiplasmina, alfa 1-antiquimotripsina, proteína de unión a tiroxina, inactivadores del complemento 1, antitrombina III, cofactor II de heparina, inactivadores del plasminógeno, proteína del gen Y, inhibidor activador del plasminógeno placentario, y proteína Z de la cebada. Esta familia no incluye el inhibidor de proteasa de leucocitos de secreción (SLPI) [Thierry Moreau et al., 2008]. Algunos miembros de la familia de las serpinas pueden ser sustratos en lugar de inhibidores de endopeptidasas, y algunas serpinas aparecen en plantas, en donde no se conoce su función.

15 Como se emplea en la presente memoria, el término “proteína alfa 1-antitripsina” indica una glicoproteína. La alfa 1-antitripsina también se refiere como inhibidor la proteinasa alfa-1 (A1PI) ya que es un inhibidor de la serina proteasa (serpina), que inhibe una gran variedad de proteasas. Protegen a los tejidos de las enzimas de células inflamatorias, especialmente de la elastasa. Un ejemplo de una secuencia para el gen Alfa 1-antitripsina se encuentra en la base de datos Genbank bajo el número de acceso NC008290.

20 Como se emplea en la presente memoria, el término “una fracción activa de” indica una fracción de una proteína con la actividad de la proteína completa. Por ejemplo, una fracción activa de la proteína trapina-2 indica una fracción de la proteína que conserva la capacidad para inhibir la HNE o una fracción activa de las proteínas de la familia Serpina indica una fracción de la proteína que conserva la capacidad de inhibición.

25 Como se emplea en la presente memoria, el término “bacteria de calidad alimentaria” indica una bacteria que se utiliza ampliamente en comidas fermentadas y posee un perfecto perfil de seguridad reconocido por la GRAS (Generalmente Reconocida Como Segura) y condición QPS (Presunción Cualificada de Seguridad) en Estados Unidos y en la Comunidad Europea, respectivamente. Tal bacteria puede ser segura en comidas funcionales o aditivos alimentarios con alegaciones relativas al mantenimiento de una buena salud y bienestar o prevención de una enfermedad.

30 Como se emplea en la presente memoria, el término “bacteria probiótica” indica una bacteria que ingerida viva en adecuadas cantidades puede ejercer efectos beneficiosos en la salud humana. Se utilizan ampliamente en la actualidad como un aditivo alimentario por sus efectos de promoción de la salud. La mayoría de las bacterias probióticas son Bacterias Ácido Lácticas (LAB) y entre ellas las cepas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las bacterias probióticas que se utilizan más comúnmente.

35 Como se emplea en la presente memoria, el término “gen *ThyA*” indica, el gen que codifica para la timidilato sintasa que es una enzima que genera timidina monofosfato (dTMP), que posteriormente se fosforila a timidina trifosfato que se usa en la síntesis y reparación del ADN.

40 Como se emplea en la presente memoria, el término “Síndrome del Intestino Irritable (SII)” es un término para una variedad de afecciones patológicas que causan malestar en el tracto gastro-intestinal. Es un trastorno intestinal funcional caracterizado por dolor abdominal crónico, malestar, hinchazón, y alteración de los hábitos intestinales en ausencia de cualquier causa orgánica.

45 Como se emplea en la presente memoria, el término “enfermedades inflamatorias intestinales (EII)” es un grupo de enfermedades inflamatorias del colon y del intestino delgado. Los tipos principales de EII son la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la pouchitis.

### **Proteínas y usos de las mismas**

50 Un primer objetivo de la divulgación se refiere a una molécula que se selecciona de la proteína trapina-2 o una fracción activa de la proteína trapina-2, un miembro de las proteínas de la familia WAP o una fracción activa de un miembro de las proteínas de la familia WAP, o una molécula que se selecciona de la familia serpina o una fracción activa de la familia serpina para el tratamiento del Síndrome del Intestino Irritable (SII).

También se divulga que el miembro de la familia Serpina es la proteína alfa 1-antitripsina.

En una realización preferida, dicha fracción de la proteína comprende al menos 75% de identidad de dicha proteína, incluso más preferiblemente al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 99%.

5 Normalmente dicha proteína o fracción de la proteína de la misma se puede usar en combinación con un agente anti-inflamatorio.

Las proteínas de la invención o fracciones de las proteínas de las mismas se pueden producir mediante cualquier técnica conocida propiamente dicha, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, bien en solitario o en combinación (combinaciones).

10 Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede producir fácilmente una parte relevante de dichas proteínas o fracción de la proteína, mediante técnicas estándar para producción de proteínas. Por ejemplo, se pueden sintetizar utilizando un método de fase sólida bien conocido, preferiblemente utilizando un aparato de síntesis de proteína disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

15 Alternativamente, las proteínas o fracción de las proteínas de la invención de las mismas se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante como es actualmente bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos se pueden obtener como expresión de productos de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el polipéptido deseado en vectores de expresión y la introducción de tales vectores en huéspedes eucariotas o procariotas adecuados que expresarán la proteína o fracción de la proteína deseada, a partir de los cuales se pueden utilizar después técnicas bien conocidas.

20 Las proteínas o fracción de las proteínas de la invención de las mismas se pueden usar en una forma (por ejemplo, purificada) o contenida en un vector, tal como una membrana o vesícula lipídica (por ejemplo un liposoma).

#### **Bacteria de calidad alimentaria**

La invención se refiere a una Bacteria Ácido Láctica de calidad alimentaria que comprende un gen recombinante que codifica para la proteína trapina-2 (elafina) o una fracción activa de la proteína trapina-2 (elafina).

25 En una realización preferida, la bacteria de calidad alimentaria según la invención es un bacteria probiótica.

En una realización preferida, la bacteria probiótica según la invención comprende un gen auxótrofo defectuoso, a través del cual la supervivencia de dicha bacteria es estrictamente dependiente de la presencia de compuestos específicos.

En otra realización preferida, el gen auxótrofo según la invención es el gen *thyA* que codifica la *timidilato sintasa*.

30 En otra realización preferida, el gen auxótrofo según la invención es *el gen alanina racemasa (a1r)* (Bron et al, 2002).

35 La inactivación del gen *thyA* de la bacteria probiótica según la invención vuelve este auxótrofo a timidina que está ausente a partir del tracto gastrointestinal (TGI). Este mutante *thyA* recombinante hará posible producir su proteína de interés pero no sobrevivirá y por tanto persiste en el TGI limitando su diseminación y confiriendo la contención biológica requerida para la bacteria recombinante. Se pueden obtener resultados similares con el gen *a1r*.

En otra realización preferida, el gen seleccionado se inserta en el gen *thyA*.

40 Preferiblemente, el gen recombinante se localiza en el cromosoma dentro del locus del gen *thyA* el cual está por tanto inactivado mediante disrupción génica. Como se emplea en la presente memoria, el término "disrupción génica" indica disrupción mediante inserción de un fragmento de ADN, disrupción mediante delección del gen, o una parte del mismo, así como cambio del gen o una parte del mismo por otro fragmento de ADN, y la disrupción se induce mediante técnicas de ADN recombinante, y no por mutación espontánea. Preferiblemente, la disrupción es el cambio del gen, o una parte del mismo, por otro gen funcional. Preferiblemente, el gen *thyA* recombinante defectuoso es un gen mutante de no-retorno.

45 Como se emplea en la presente memoria, el término "mutante de no-retorno" indica que la frecuencia de reversión es menor de  $10^{-8}$ , preferiblemente la frecuencia de reversión es menor de  $10^{-10}$ , incluso más preferiblemente, la frecuencia de reversión es menor de  $10^{-12}$ , incluso más preferiblemente, la frecuencia de reversión es menor de  $10^{-14}$ , más preferiblemente, la frecuencia de reversión no es detectable utilizando los métodos habituales conocidos por el experto en la técnica.

50 En una realización preferida, la cepa de la bacteria de calidad alimentaria según la invención es una cepa de *L. lactis* o una cepa de *Lactobacillus casei* o una cepa de *L. lactis htrA* [Poquet et al., 2000] o una cepa de *Lactobacillus plantarum* de una cepa de *Bifidobacterium longum*.

En una realización preferida, la bacteria de calidad alimentaria según la invención es una cepa *Lactobacillus casei*.

En una realización más preferida, el gen según la invención codifica para trapina-2.

De hecho, los inventores mostraron que trapina-2 se expresa de forma natural en la mucosa colónica humana, con una expresión prominente en células del epitelio intestinal (Motta et al.) y que, los pacientes con EII muestran una regulación a la baja de trapina-2 en tejidos en comparación con sujetos sanos (Motta et al.).

5 Además, los inventores han demostrado en diferentes modelos de colitis, que la sobreexpresión de trapina-2 es protectora contra el desarrollo de colitis (en la expresión constitutiva y transitoria). Por otra parte, la sobreexpresión de trapina-2 en modelos de colitis es capaz de inhibir completamente el incremento de elastasa y actividades similares a tripsina asociadas con colitis.

10 Finalmente, la sobreexpresión de trapina-2 en ratones es también capaz de inhibir significativamente la colitis inducida por aumentos de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-17A, TNF-alfa, Interferón-gamma, MCP-1 y KC).

Todos estos resultados están a favor del reparto de trapina-2 y otras proteasas a partir de WAP o familia de Serpina que tienen propiedades similares para tratar la EII. Como se muestra en los resultados de abajo, las bacterias de calidad alimentaria son los medios más seguros y eficaces para repartir este tipo de proteasas al intestino.

15 También se describe que el gen según la divulgación codifica para la proteína alfa 1-antitripsina. De hecho, la proteína alfa 1-antitripsina inhibe como la tripsina las actividades asociadas con la EII (similar a colitis) y tiene por tanto similares efectos a la trapina-2.

En otra realización preferida, la cepa de bacteria de calidad alimentaria según la invención es una cepa de *Lactobacillus casei* que comprende un gen que codifica para trapina-2.

20 En otra realización preferida, la cepa bacteriana de calidad alimentaria según la invención es una cepa de *Lactobacillus casei* que comprende un gen que codifica para trapina-2 insertada en el gen *thyA*.

En otra realización, la bacteria de calidad alimentaria según la invención es útil para el tratamiento de afecciones inflamatorias intestinales.

25 En otra realización preferida, la bacteria de calidad alimentaria según la invención es útil para el tratamiento de una EII y/o SII.

Las afecciones inflamatorias se pueden seleccionar de las EII, SII, enfermedad inflamatoria pulmonar, enfermedad inflamatoria articular o la enfermedad inflamatoria urogenital.

### Composiciones

30 Otro objetivo de la invención se refiere a una composición terapéutica que comprende una bacteria de calidad alimentaria según la invención.

En otra administración preferida, la composición terapéutica según la invención se destina a la administración oral a un sujeto. Por ejemplo, las composiciones pueden estar en la forma de una suspensión, comprimido, píldora, cápsula, granulado o polvo.

35 En una composición terapéutica líquida, la bacteria de calidad alimentaria según la invención se presenta, libre y no inmovilizada, en suspensión. La suspensión tiene una composición que asegura las condiciones fisiológicas para una bacteria probiótica, para que en la presión osmótica particular dentro de la célula no conduzca a la lisis.

40 En una composición terapéutica sólida, la bacteria de calidad alimentaria según la invención se puede presentar en forma libre, preferiblemente en forma liofilizada, o en forma inmovilizada. Por ejemplo, la bacteria de calidad alimentaria según la invención puede estar incluida en una matriz de un gel que proporciona protección para las células.

45 Una composición terapéutica destinada para administración oral y que contiene la bacteria de calidad alimentaria según la invención en una forma inmovilizada o no-inmovilizada se proporciona preferiblemente con un recubrimiento resistente al jugo gástrico. De ese modo se garantiza que la bacteria de calidad alimentaria contenida en la composición terapéutica pueda pasar libre e intacta a través del estómago y que la liberación de la bacteria de calidad alimentaria tenga lugar primero en las regiones intestinales superiores.

50 En otro aspecto de la invención, la composición terapéutica contiene suficientes unidades formadoras de colonias (UFC) de la bacteria de calidad alimentaria capaces de formar la proteína según la invención para que con la administración múltiple de la composición terapéutica de acuerdo al paciente, se cure el estado de la EII o SII, se pare la progresión de la EII o SII, y/o se alivien los síntomas de la EII o SII. Según la invención, se proporciona en particular que una composición que contiene  $1 \times 10^8$  -  $1 \times 10^{11}$ , preferiblemente  $1 \times 10^9$  -  $1 \times 10^{10}$  UFC de la bacteria de calidad alimentaria según la invención.

5 En otra realización preferida de la invención, la composición terapéutica que contiene la bacteria de calidad alimentaria se administra intrarrectalmente. Una administración rectal tiene lugar preferiblemente en forma de un supositorio, enema o espuma. La administración intrarrectal es particularmente adecuada para las enfermedades inflamatorias intestinales que afectan a las secciones intestinales inferiores, por ejemplo el colon. Las administraciones intranasales son también adecuadas para tratar enfermedades pulmonares crónicas tal como la fibrosis quística y la EPOC.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición alimenticia que comprende una bacteria de calidad alimentaria según la invención.

10 En una realización preferida, las composiciones alimenticias según la invención se destinan para la administración oral a un sujeto. Por ejemplo, las composiciones pueden estar en la forma de una suspensión, comprimido, píldora, cápsula, granulado, polvo o yogurt.

En una realización preferida, la composición alimenticia puede contener  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^{11}$ , preferiblemente  $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{10}$  UFC de la bacteria de calidad alimentaria según la invención.

15 En una realización preferida, la composición alimenticia se puede administrar al paciente a una dosis diaria de  $10^{10}$  de bacteria.

La invención se ilustrará además mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en ninguna manera como limitantes del alcance de la invención.

### Figuras

20 Figura 1: diferencias de peso (A), puntuación macroscópica (B), grosor de la pared (C), y actividad de la mieloperoxidasa (MPO) (D) en tejidos colónicos de ratones que tenían agua o agua + DSS (3%) en sus bebederos, y que recibieron tratamientos orales diarios durante 7-días con cepas *L. lactis* de tipo salvaje, o de *L. lactis* recombinante que expresan bien Elafina o IL-10. Se observaron diferencias significativas en los ratones tratados con PBS comparado con los que habían recibido DSS \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$ , y \*\*\* para  $p < 0,005$ . Se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones tratados con *L. lactis* de tipo salvaje  $\psi$  para  $p < 0,05$ ,  $\psi \psi$  para  $p < 0,01$ , y  $\psi \psi \psi$  para  $p < 0,05$ . Se observaron diferencias significativas entre el grupo PBS + DSS y el grupo PBS-agua # para  $p < 0,05$ , # # para  $p < 0,01$ , y # # # para  $p < 0,005$ . Se observaron diferencias significativas en comparación con el grupo *L. lactis* recombinante IL-10  $\omega$  para  $p < 0,05$ ,  $\omega \omega$  para  $p < 0,01$ , y  $\omega \omega \omega$  para  $p < 0,005$ .

30 Figura 2: Actividad similar a tripsina (A) y actividad elastasa (B) en lúmenes colónicos lavados de ratones que tenían agua o agua + DSS (3%) en sus bebederos, y que recibieron tratamientos orales diarios durante 7-días con cepas de *L. lactis* de tipo salvaje, o *L. lactis* recombinante que expresan o bien Elafina o IL-10.  $\epsilon$  significa niveles indetectables. Se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones tratados con PBS de los que recibieron DSS \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$ . Se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones tratados con *L. lactis* de tipo salvaje  $\psi$  para  $p < 0,05$ . Se observaron diferencias significativas entre el grupo PBS + DSS y el grupo PBS-agua # para  $p < 0,05$ , # # para  $p < 0,01$ , y # # # para  $p < 0,005$ .

35 Figura 3: Puntuación macroscópica (A), grosor de la pared (B), y actividad de la mieloperoxidasa (MPO) (C) en tejidos colónicos de ratones que habían tenido agua o agua + DSS (3%) en sus bebederos, y que habían recibido tratamientos orales diarios durante 7-días con cepas *Lb. casei* de tipo salvaje, o de *Lb. casei* recombinante que expresan Elafina. Se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones tratados con PBS de los que recibieron DSS \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$ , y \*\*\* para  $p < 0,005$ . Se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones tratados con *Lb. casei*  $\Psi$  para  $p < 0,05$ ,  $\psi \psi$  para  $p < 0,01$ , y  $\psi \psi \psi$  para  $p < 0,005$ .

40 Figura 4: Actividad similar a tripsina (A) y actividad elastasa (B) en lúmenes colónicos lavados de ratones que tenían agua o agua + DSS (3%) en sus bebederos, y que recibieron tratamientos orales diarios durante 7-días con cepas de *Lb. casei* de tipo salvaje, o *Lb. casei* recombinante que expresan elafina. Se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones tratados con PBS de los que recibieron DSS \* para  $p < 0,05$ , y se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones tratados con *Lb. casei*  $\Psi$  para  $p < 0,05$ , y  $\psi \psi$  para  $p < 0,01$ .

45 Figura 5: Concentración de proteína de RANTES (A), TNF $\alpha$  (B), IL-6 (C), MCP-1 (D), KC (E), INF $\gamma$  (F) y IL-17 (G) detectada en tejidos colónicos de ratones que tenían agua o agua + DSS (3%) en sus bebederos, y que recibieron tratamientos orales diarios durante 7-días con *Lb. casei* de tipo salvaje, o *Lb. casei* recombinante que expresa Elafina.  $\epsilon$  significa niveles indetectables. Se observaron diferencias significativas en los ratones tratados con PBS de los que recibieron DSS \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$ , y \*\*\* para  $p < 0,005$ .  $\Psi$  mostró diferencias significativas para  $p < 0,05$ , en comparación con los ratones tratados con *L. lactis* de tipo salvaje. Se observaron diferencias significativas entre el grupo PBS + DSS y el grupo de PBS-agua # para  $p < 0,05$ , # # para  $p < 0,01$ , y # # # para  $p < 0,005$ .

50 Figura 6: Concentración de proteína de IL-2 (A), IL-4 (B), IL-5 (C), IL-10 (D) e IL-13 (E) detectada en tejidos colónicos de ratones que tenían agua o agua + DSS (3%) en sus bebederos, y que recibieron tratamientos orales diarios durante 7-días con *Lb. casei* de tipo salvaje, o *Lb. casei* recombinante que expresa Elafina. Se observaron

diferencias significativas en los ratones tratados con PBS de los que recibieron DSS \* para  $p < 0,05$ , y \*\* para  $p < 0,01$ . Se observaron diferencias significativas en comparación con los ratones tratados con *Lb. casei* de tipo salvaje  $\psi$  para  $p < 0,05$ , y  $\psi \psi$  para  $p < 0,01$ .

5 Figura 7: Número total de comportamientos de dolor (A) o contracciones abdominales y conductas de lamidos, estiramientos o aplastamiento (B) en ratones que recibieron PBS intracolónicamente (n=5), o aceite de mostaza (0,01% (v/v) en etanol 70%), y que recibieron durante los 7-días previos, pre-tratamientos de PBS mediante sonda oral (n=8), *L. lactis* de tipo salvaje (n=8), o *L. lactis* recombinante que expresan bien elafina (n=8) o IL-10 (n=5). Se observaron diferencias significativas en ratones tratados con PBS en comparación con los que recibieron aceite de mostaza \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$ , y \*\*\* para  $p < 0,005$ .  $\Psi$  mostraba diferencias significativas para  $p < 0,05$ , en comparación con ratones tratados con *L. lactis* de tipo salvaje.

10 Figura 8: Elafina secretada por cepas de *L. lactis* de tipo salvaje y *htrA*. Experimentos de Western blot realizados con anticuerpos anti-elafina en células (C) y en extractos de sobrenadante (S) de cepas de tipo salvaje (*wt*) o *htrA* (*htrA*). La producción de elafina se indujo mediante nisina a partir de cultivos en fase-exponencial de cepas *wt* o *htrA* (que contienen ambas el vector de expresión en donde se puede inducir la expresión del gen de elafina mediante adición de nisina).

15 Figura 9: Efectos protectores de las cepas *L. lactis wt* y *htrA* mutante en DSS 5% en un modelo con colitis inducida. Se evaluaron los daños macroscópicos (A), histológicos (B) y actividades MPO (C) en diferentes grupos de 10 ratones tratados bien con agua (control negativo) o con DSS 5%. Primero se trataron dos grupos control i) con agua y alimentación oral con PBS (grupo control negativo) y ii) con DSS 5% y alimentación oral con PBS (grupo control positivo). Los otros grupos se trataron todos con DSS 5% y con bien la cepa *wt* (WT), cepa *wt* que expresa elafina (Elafina) y cepa mutante *htrA* que expresa elafina (Elafina+).

20 Figura 10: Efectos protectores de la cepa *L. casei wt* y de cepas *L. casei* que expresan SOD, que expresan elafina, y que expresan IL-10 en DSS 5% en un modelo con colitis inducida. Se evaluaron los daños macroscópicos (A), histológicos (B) y actividades MPO (C) en diferentes grupos de 10 ratones tratados bien con agua (control negativo) o con DSS 5%. Primero se trataron dos grupos control i) con agua y alimentación oral con PBS (grupo control negativo) y ii) con DSS 5% y alimentación oral con PBS (grupo control positivo). Los otros grupos se trataron todos con DSS 5% y con bien la cepa *L. casei wt* (WT) o con cepas *L. casei* que expresan superóxido dismutasa (SOD), elafina (Elafina) o IL-10. \* y \*\* indican que los datos son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) de los datos obtenidos con *L. casei wt*.

25 Figura 11: Actividad mieloperoxidasa (MPO) (D) en tejidos colónicos de ratones. La actividad mieloperoxidasa (MPO) (D) se midió en tejidos colónicos de ratones que tenían agua o agua + DSS (3%) en sus bebederos, y que recibieron tratamientos orales diarios durante 7-días con i) cepas *L. lactis* WT, *L. lactis* recombinante y *L. lactis htrA* que expresan bien Elafina o IL-10 y con ii) cepa *L. casei wt* y cepas *L. casei* que expresan SOD, que expresan elafina y que expresan IL-10. \* y \*\* indican que los datos son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) de los datos obtenidos con *L. casei wt*.

30 Figura 12: Secreción de elafina en una cepa *L. casei* WT donde se expresa el gen de elafina bajo el control de un promotor inducible de EDTA [Llull D y Poquet I. 2004; EP 1 537 215 y FR 98 16462]. La cepa *L. lactis* WT que expresa elafina se cultivó durante la noche en presencia (+) o no (-) de EDTA, un agente quelante (en este modelo, la expresión del gen de elafina se controla mediante un promotor lactocócico que se puede inducir mediante adición de EDTA: en el cromosoma, este promotor controla la expresión de genes que codifican un sistema de captación ABC específico de zinc y se reduce bajo condiciones de inanición que se pueden imitar mediante la adición de EDTA). Después, las proteínas se extrajeron y fraccionaron entre las células (C) y las fracciones sobrenadantes (S) y se realizaron experimentos Western blot utilizando anticuerpos anti-elafina.

### Ejemplo

#### 45 Material y Métodos

Clonación de Elafina en una bacteria ácido láctica recombinante (*Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei*)

Clonación y expresión de elafina en una bacteria ácido láctica

50 Se amplificó por PCR el gen que codifica para elafina a partir de DK6-elafina (14). Se usaron las secuencias de cebadores: 5' inicial Elafina (CCAATGCATCAGCAGCTGTACGGGAGTTCC) (SEQ ID N°1) y 3' final-Elafina (GGACTAGTCCTCACTGGGGAACGAAACA GGCC) (SEQ ID N°2). Los cebadores se diseñaron para eliminar primero los codones de la región de elafina que codifica para el péptido señal (SP) y se reemplazaron por la SP de la proteína Usp45 (PS<sub>Usp45</sub>), la principal proteína secretada a partir de *L. lactis*. Para este objetivo, se digirió, purificó y clonó el producto por PCR en pSEC, un vector de secreción de *L. lactis*. En el plásmido resultante pSEC: elafina, se fusionó la elafina en una estructura con un fragmento de ADN que codifica para RBS y PS<sub>Usp45</sub>. La expresión del casete se controla mediante el promotor inducible P<sub>nisA</sub>, cuya actividad depende de la concentración de nisina usada. Este plásmido se introdujo después en una cepa de *L. lactis* que soporta los genes reguladores de nisina *nisR* et *nisK* (*L. lactis* NZ9000) para dar lugar a la cepa recombinante: NZ(pSEC: elafina). Las herramientas que se usaron

(replicones, promotor, RBS y SP) son funcionales en cepas lactobacilo tales como *Lactobacillus casei* y *Lb. plantarum*. Estas dos cepas (que soportan cada una los genes *nisRK* en su cromosoma) se han elegido debido a su capacidad de persistencia en el tracto digestivo (hasta 4 días, al contrario de las 24 a 48 horas en *L. lactis*). Además, recientemente hemos demostrado que la cepa *Lb. casei* BL23 posee propiedades anti-inflamatorias en un modelo de colitis inducida por DSS [Rochat et al, 2007]. Tenemos por lo tanto a nuestra disposición cepas no-inmuno-moduladoras débilmente (*L. lactis*) y fuertemente (*Lb. plantarum*) persistentes, así como cepas inmuno-moduladoras fuertemente persistentes (*Lb. casei*), permitiéndonos evaluar la viabilidad de combinar los efectos anti-inflamatorios intrínsecos de las cepas usadas con las de las moléculas sobre-expresadas.

Para la inducción del promotor  $P_{nisA}$ , se cultivaron cepas recombinantes de *L. lactis* a  $OD_{600} \approx 0,4-0,6$  y se indujeron después con 10 ng/ml de nisina (Sigma) durante 1 hora. La funcionalidad de esta inducción se ensayó después como sigue: se separaron los cultivos NZ (pSEC:elafina) ( $OD_{600} \approx 1$ ) en gránulos y sobrenadantes y el contenido en elafina se midió mediante ELISA y/o Western Blot.

#### Animales

Se obtuvieron ratones C57B16 (6-8 semanas de edad) a partir de Janvier (St Quentin Fallavier) y mantuvieron a temperatura ambiente, bajo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y teniendo acceso libre a comida y agua, excepto el día antes de la inducción de la colitis, que se mantuvieron en ayunas durante 12 horas. Todos los procedimientos se aprobaron por el Comité institucional de cuidado animal y servicios veterinarios.

#### Inducción de colitis y diseño del estudio

Se indujo inflamación colónica mediante tratamientos con Sulfato de Dextrano Sódico (DSS). En detalle, se disolvió DSS en el agua de bebida (3 ó 5% p/v) y los animales eran libres para beber esta disolución durante 7-días. Se midió la consumición de agua en los grupos tratados con DSS y se comparó con el agua de bebida de los ratones sin tratamiento previo: no se observaron diferencias para el volumen de líquido consumido, entre los ratones que bebieron agua de los que bebieron DSS. Los ratones se trataron oralmente a diario, con 100  $\mu$ l de  $5,10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc) de *L. lactis* o *Lb. casei* de tipo salvaje, de elafina recombinante, o en medio bacteriano en solitario. El primer tratamiento comenzó al mismo tiempo que se añadió DSS al agua de bebida y el último tratamiento fue en el día del sacrificio (día 7). Se midió diariamente el peso corporal y el índice de supervivencia después de la inducción de colitis. En el día 7 después de añadir DSS a su agua de bebida, los ratones se sacrificaron y se recogieron los cólores para medir diversos parámetros de inflamación: puntuación macroscópica, grosor del intestino, actividad mieloperoxidasa (MPO) actividad proteolítica, expresión de citoquina.

#### Medición de parámetros inflamatorios

Se evaluó el daño macroscópico como se describe anteriormente (5;15;16). En resumen, cuando se observaron los siguientes parámetros se proporcionó una puntuación de 1: hemorragia, edema, estenosis, ulceración, sangre fecal, moco, y diarrea. El eritema se puntuó con un máximo de 2 dependiendo de la longitud del área que estaba afectada (0: ausencia, 1: menos de 1 cm, 2: más de 1 cm). La adhesión se puntuó en base a su gravedad (0: ausencia, 1: moderada, 2: grave).

La MPO se midió como un índice de infiltración granulocítica como se describe previamente (5;15;16), en tejidos colónicos recogidos en el momento del sacrificio. Las muestras de tejido se homogeneizaron en una disolución de 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetil amonio en un tampón fosfato (pH 6), y se centrifugaron a 13.000 X G durante 2 minutos. Los sobrenadantes se añadieron a un tampón que contiene 1% de peróxido de hidrógeno y dihidrocloruro de O-dianisidina. Las lecturas de densidad óptica para la disolución enzimática se leyeron durante 2 minutos a 450 nm.

Para las mediciones de proteína citoquina y quimioquina, muestras colónicas congeladas recogidas en el sacrificio se homogenizaron utilizando un polytron durante 30 segundos a 4°C en 500  $\mu$ l de tampón de lisis celular (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM,  $Na_2EDTA$  1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%, pirofosfato sódico 2,5 mM, beta-glicerofosfato 1 mM,  $Na_3VO_4$  1 mM, leupeptina 1  $\mu$ g/ml ; Cell Signalling, Sigma) enriquecido con un cóctel de anti-proteasas (Roche Diagnostics, Meylan, Francia). Tras centrifugación (10.000 X G, 10 minutos, 4°C), los sobrenadantes se filtraron en columnas fragmentadoras QIA (Qiagen, Francia) y cincuenta microlitros de este homogenizado se usó para la dosificación simultánea de citoquinas y quimioquinas utilizando citometric bead array en una clasificadora celular por fluorescencia FACSCalibur. Los valores brutos se normalizaron al peso de tejido (de 30 a 50 mg de media) y se extrapolaron las concentraciones de citoquinas a partir de las curvas estándar con la ayuda del programa informático FCAP Array®. De acuerdo con la información del fabricante, sólo se consideraron valores por encima del límite de detección de citoquina.

#### Actividad de la serina proteasa en tejidos colónicos y lavados lumbinales

Como se describe anteriormente (17), tras el sacrificio, se eliminó el colon entero y se instiló y lavó dos veces 1 ml de PBS a través del lumen. Se midieron ambas actividades proteolíticas (actividad similar a tripsina y elastasa) en los lavados lumbinales. La actividad similar a tripsina y similar a elastasa se midieron utilizando tosilo-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilida (150  $\mu$ M, Sigma) y MeO-succinil-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilida (100  $\mu$ M, Sigma, Saint Quentin Fallavier,



Francia) respectivamente como sustratos. Las muestras se re-suspendieron (20  $\mu$ l para la actividad tripsina o 10  $\mu$ l para la actividad elastasa) en su tampón respectivo: Tris/HCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH=8 para la actividad tripsina y Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, triton X100 0,1% para la actividad elastasa. El cambio en la absorbancia a 405 nm se determinó durante 30 minutos a 37°C con un lector de microplaca NOVOSstar™ (BMG Labtech, Francia). La actividad se comparó frente a una disolución estándar conocida de tripsina a partir de páncreas porcino (Sigma) o de elastasa de neutrófilo humana (Sigma). La concentración de proteína en los lavados luminales se determinó utilizando dosificación colorimétrica del ácido bicinchonínico en microplaca (BCA kit®, Pierce, Thermo Scientific, Courtaboeuf, Francia) y se utilizó para estandarizar la actividad proteolítica en cada una de las muestras.

#### *Inducción y medida de los comportamiento de dolor visceral en respuesta al Aceite de mostaza*

Se realizaron cultivos de las tres cepas de *L. lactis* (*L. lactis* wt, *L. lactis*-Elafina, *L. lactis*-IL-10) en un medio M17 (Oxoid) enriquecido con glucosa (0,5%) enriquecido con Cloranfenicol (10  $\mu$ g/mL) a 30°C sin agitación. Las bacterias a partir de los cultivos durante la noche se cultivaron en un medio fresco a 1/50 (v/v) hasta OD<sub>600</sub>=0,4 a 0,6. Las bacterias se cultivaron después durante 1 hora más con Nisina (1 ng/mL), añadida para permitir la expresión de la proteína recombinante. Se recogieron las bacterias por centrifugación hasta 450 g y se lavaron con PBS estéril. Se resuspendieron los gránulos en PBS estéril hasta una concentración final de 5X10<sup>10</sup> ufc/mL. Se trataron diariamente grupos de 4 a 8 ratones con 100  $\mu$ L (5X10<sup>9</sup> ufc) de suspensión bacteriana mediante administración intragástrica durante siete días. En el día 8, a los ratones se les administró 50  $\mu$ L de PBS o aceite de mostaza (0,01% (v/v) en etanol 70%) mediante instilación intracolónica, realizada bajo anestesia ligera de isoflurano. El número de respuestas de comportamiento relacionadas con el dolor (retracciones abdominales, lamidos del abdomen, estiramientos y aplastamiento de la parte inferior del abdomen contra el suelo) se contaron durante 20 minutos.

#### *Estadísticas*

Se realizaron comparaciones entre los grupos utilizando un ensayo t de Student de doble cola con corrección Bonferroni. Los datos se expresan como medio  $\pm$ SEM, y se consideró significativo un P valor menor de 0,05.

#### **Resultados**

##### *Lactococcus lactis* recombinante que expresa elafina que protege contra el desarrollo de colitis por DSS en ratones

Como se esperaba, la colitis inducida por DSS (5% DSS) causó pérdida de peso grave en todos los grupos de ratones en comparación con los ratones control que bebieron agua. Ninguno de los tratamientos de bacteria ácido láctica modificaron significativamente esta pérdida de peso (Fig. 1A). El DSS en el agua de bebida también causó daño macroscópico, incremento del grosor de la pared e incremento de la actividad MPO en tejidos colónicos (Fig. 1B, C, D). Los ratones que se trataron con *L. lactis* de tipo salvaje no mostraron un descenso significativo en el grosor de la pared colónica y en la actividad MPO, sólo se observó un ligero descenso en la puntuación del daño macroscópico en este grupo, comparado con los ratones tratados con DSS en solitario. Por el contrario, los ratones tratados con *L. lactis* recombinante que expresa elafina mostraron después de la inducción de colitis por DSS una puntuación en el daño macroscópico significativamente reducido y un significativo menor incremento en el grosor de la pared, pero la actividad MPO no era diferente de la del grupo DSS en solitario (Fig. 1B, C, D). Además, los ratones tratados con *L. lactis* recombinante que expresa citoquina IL-10 mostraron una puntuación del daño macroscópico y de la actividad MPO reducidas después de la inducción de colitis por DSS, pero no se modificó el grosor de la pared mediante este tratamiento comparado con el DSS en solitario (Fig. 1B, C, D). En ratones no-inflamados ninguno de los tratamientos modificó los parámetros inflamatorios en comparación con los ratones control sin tratamiento previo.

Incremento inducido por DSS en la actividad de tipo tripsina era significativamente menor en ratones tratados con *L. lactis* recombinante que expresa Elafina, pero no cambió en ratones tratados con *L. lactis* tipo salvaje o *L. lactis* recombinante que expresa IL-10 (Fig. 2A). Sólo el tratamiento con *L. lactis* recombinante que expresa elafina fue capaz de reducir significativamente la actividad elastasa en el incremento inducido por DSS (Fig. 2B).

##### *Lactobacillus casei* recombinante que expresa elafina que protege contra el desarrollo de colitis por DSS en ratones

Aunque el tratamiento del ratón con *Lb. casei* de tipo salvaje redujo significativamente los valores macroscópicos observados después de la inducción de colitis por DSS, este tratamiento fracasó para reducir el incremento del grosor de la pared y la actividad MPO comparado con el DSS en solitario (Fig. 3A, B, C). Por el contrario, los tratamientos con *Lb. casei* recombinante que expresan elafina redujeron significativamente todos los parámetros de inflamación: puntuación del daño macroscópico, grosor de la pared colónica y actividad MPO (Fig. 3A, B, C).

La actividad similar a tripsina en el incremento inducido por DSS se redujo significativamente en ratones tratados con *Lb. casei* recombinante que expresa Elafina, comparado con los ratones tratados con *Lb. casei* de tipo salvaje (Fig. 4A). El nivel de la actividad de elastasa se redujo también significativamente en ratones con colitis (DSS) tratados con *Lb. casei* recombinante que expresa elafina, comparado con ratones inflamados (colitis) con *Lb. casei* de tipo salvaje, o incluso comparado con ratones inflamados tratados con PBS (Fig. 4B).

La expresión proteica de la quimioquina RANTES no se aumentó significativamente mediante colitis por DSS en el momento de tiempo observado (7-días después del comienzo del tratamiento DSS). *Lb. casei* de tipo salvaje o que secreta Elafina fracasó para modificar el nivel de la expresión RANTES en ratones tratados con DSS (Fig. 5A). TNF $\alpha$ , IL-6, MCP1, KC, INF $\gamma$  y IL-17A estaban todos significativamente aumentados en la colitis por DSS, 7 días después de la inducción (Fig. 5B a G). El tratamiento de los ratones con *Lb. casei* recombinante que expresa elafina redujo significativamente la expresión proteica de IL-6, MCP1, KC y IL-17 (Fig. 5C, D, E, G), pero falló para reducir el nivel de expresión de otras citoquinas inflamatorias tales como TNF $\alpha$  y INF $\gamma$  (Fig. 5B y F). Es interesante que, aunque la colitis por DSS no causó ningún incremento de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13 (Fig. 6A a E), el tratamiento de los ratones con *Lb. casei* recombinante para elafina alcanzó significativamente la expresión de estas citoquinas, pero sólo en un contexto de colitis (después de tratamiento con DSS). Este incremento en las citoquinas Th2 en respuesta al *Lb. casei* recombinante para elafina, podría explicar al menos en parte, los efectos anti-inflamatorios de esta bacteria recombinante. Los niveles de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13 no se modificaron por ninguno de los otros tratamientos en cualquiera de los ratones inflamados (DSS) o no inflamados (Fig. 6A a E).

#### *Lactococcus lactis* recombinante para la expresión de elafina en el descenso del comportamiento al dolor visceral

La administración intracolónica de aceite de mostaza causó un aumento significativo en el número de comportamientos al dolor: tanto el número de retracciones abdominales como en el número de comportamientos de dolor integrados tales como lamidos, estiramientos y aplastamiento contra el suelo (Fig. 7A y B). Considerando todos los comportamientos en conjunto, el tratamiento con *L. lactis* de tipo salvaje, que secreta IL-10 recombinante o elafina, no tuvo efecto (Fig. 7A). Cuando se consideran sólo los comportamientos de dolor integrados, *L. lactis*-elafina, pero no IL-10 recombinante o de tipo salvaje, redujo significativamente el número de comportamientos al dolor (Fig. 7B). Por otra parte, sólo *L. lactis* recombinante que expresa elafina indujo un notable descenso en el número de comportamientos al dolor comparado con el tratamiento PBS o con el tratamiento *L. lactis* de tipo salvaje (Fig. 7B).

#### Resultados con la cepa *htrA*

*L. lactis* expresa sólo un proteasa extracelular constitutiva llamada *htrA* que degrada todas las proteínas desdobladas exportadas (Poquet et al, 2000 y solicitudes de patente de E.E.U.U. 6.994.997 y FR2787810). Se preparó una cepa inactivada de *L. lactis* en un gen *htrA* mutante y se permitió aumentar la razón de producción de varias proteínas heterólogas secretadas en *L. lactis* (Poquet et al, 2000 y Miyoshi et al, 2002). Según la invención, se clonó el casete de expresión de elafina en el *htrA* mutante. Se compararon los niveles de producción de elafina en el *htrA* mutante y en la cepa de tipo salvaje (wt) mediante experimentos Western blot (Fig. 8). Se observó un incremento significativo de la elafina secretada en el sobrenadante de la *htrA* mutante comparado al de la cepa wt. Por tanto, la cepa *htrA* permitirá mayor producción y secreción de los niveles de elafina.

Estas dos cepas se ensayaron después en un modelo de colitis inducida por DSS y confirmamos *in vivo* que el *htrA* mutante protege a los ratones contra los daños de la colitis mejor que la cepa wt (Fig. 9A, B y C).

#### Comparación de resultados

Evaluamos en paralelo los efectos protectores de las cepas *L. casei* que producen IL-10, superóxido dismutasa (SOD) y elafina en un modelo de colitis inducida por DSS 5%. Debe recordarse que *L. casei* posee dos diferencias importantes comparado con *L. lactis*: i) mayor persistencia en el TGI y ii) propiedades anti-inflamatorias intrínsecas (Rochat et al, 2007; Watterlot et al, 2010). Como se muestra en la Fig. 10A/B/C, los mejores efectos protectores sobre los tres criterios (macroscópico, histológico y actividad MPO) se obtuvieron con la cepa *L. casei* que produce Elafina seguido por la cepa de *L. casei* que produce SOD. La cepa *L. casei* que produce IL-10 proporcionó sólo efectos pobres.

Por otra parte, la cepa *L. casei* que produce elafina permitió una mejor protección que las dos cepas de *L. lactis* (cepa *L. lactis* wt y *htrA*) (Fig. 11).

Estos resultados son muy sorprendentes considerando el hecho de que elafina posee actividades antibacterianas *in vitro* e *in vivo* [Simpson AJ et al, 1999]. Por consiguiente, el experto en la técnica habría esperado una pobre o ninguna producción por la bacteria hospedadora. Por el contrario, los resultados obtenidos por los inventores muestran una producción muy buena de elafina por el probiótico y una mejora del efecto terapéutico.

Por otra parte, ambos estudios *in vitro* e *in vivo* (incluyendo los estudios clínicos) mostraron que la falta de protección del hospedador antimicrobiano es potencialmente perjudicial en enfermedades colónicas [Salzman NH et al, 2003 y Bevins CL et al, 2009].

Por tanto, la actividad anti-microbiana pleiotrópica/anti-inflamatoria de la elafina la hace una muy buena molécula terapéutica candidata en comparación a IL-10.

Inducción por EDTA de la expresión del Promotor Zinc (PZn) controlada por *zitR* en *L. lactis*. La producción de elafina en *L. lactis* dirigida por PZn *zitR* [Llull D y Poquet I. 2004] se ensayó mediante análisis Western blot después de 1 hora de inducción con 1 mM de EDTA. Muestras de cultivos no inducidos, de gránulo celular (C) y

sobrenadante (S), producen niveles y secreción de elafina muy bajos mientras que cultivos inducidos dan como resultado niveles de expresión y secreción mayores (Fig. 12).

**Referencias**

A través de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- 5 Bevins CL, Stange EF, Wehkamp J. La expresión reducida de defensina en células de Paneth en la enfermedad ileal de Crohn es independiente de la inflamación, pero está ligada al genotipo 1007fs NOD2. *Gut*. 2009 Jun; 58(6):882-3.
- Braat, H., M.P.Peppelenbosch, y D. W.Hommes. 2003. Terapia basada en interleuquina-10 para la enfermedad inflamatoria intestinal. *Expert. Opin. Ther.* 3:725-731.
- 10 Braat, H., P.Rottiers, D. W. Hommes, N.Huyghebaert, E.Remaut, J.P.Remon, S.J.van Deventer, S.Neirynck, M.P.Peppelenbosch, y L.Steidler. 2006. Ensayo en Fase I con una bacteria transgénica que expresa interleuquina-10 en la enfermedad de Crohn. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4:754-759.
- Bron Peter A., Marcos G. Benchimol, Jolanda Lambert, Emmanuelle Palumbo, Marie Deghorain, Jean Delcour, Willen M. de Vos, Michiel Kleerebezem, y Pascal Hols. Uso del gen a1r como Marcador de Selección de la Bacteria Ácido Láctica de Calidad Alimentaria. *Microbiología Medioambiental*, Nov. 2002, p. 5663-5670.
- 15 Cenac, N., C.N.Andrews, M.Holzhausen, K.Chapman, G.Cottrell, P.Andrade-Gordon, M.Steinhoff, G.Barbara, P.Beck, N.W.Bunnet, K.A.Sharkey, J.G.Ferraz, E.Shaffer, y N.Vergnolle. 2007. Papel para la actividad proteasa en el dolor visceral en el síndrome del intestino irritable. *J.Clin.Invest* 117:636-647.
- Hedin, C., K.Whelan, y J.O.Lindsay. 2007. Prueba para el uso de probióticos y prebióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal: una revisión de los ensayos clínicos. *Proc. Nutr.Soc.* 66:307-315. Sallenave, J.-M. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372 (1991), pp. 13-21.
- 20 Hyun, E., P.Andrade-Gordon, M.Steinhoff, y N. Vergnolle. 2008. Proteasa-activada activación-receptor 2: un agente principal en la inflamación intestinal. *Gut* 57:1222-1229.
- Llull D. e I. Poquet. Nuevo Sistema de Expresión Estrechamente Controlado por la Disponibilidad de Zinc en *Lactobacillus lactis*. *Microbiología medioambiental*, Sept. 2004, p. 5398-5406.
- 25 Motta Jean-Paul, Laurent Magne, Delphyne Descamps, Corinne Rolland, Camila Squarzoni-Dale, Perrine Rousset, Laurence Martin, Nicolas Cenac, Viviane Balloy, Michel Huerre, Dieter Jenne, Julien Wartelle, Azzaq Belaouaj, Emmanuel Masl, Jean-Pierre Vinel, Laurent Alric, Michel Chignard, Nathalie Vergnolle, Jean-Michel Sallenave. La modificación del patrón de proteasa, anti-proteasa mediante la sobre-expresión de elafina protege a los ratones de la colitis. *Gastroenterología* 2011, In Press.
- 30 Poquet I, saint V, Seznec E, Simoes N, Bolotin A, Gruss A. HtrA es la única superficie de la proteasa constitutiva en *Lactobacillus lactis* y se requiere para la producción proteica natural. *Mol Microbiol.* 2000 Mar;35(5):1042-51.
- Sallenave J.-M, Silva A., Marsden M.E. y Ryle A.P. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8 (1993), pp. 126-133.
- Sallenave JM. Inhibidor de la proteasa de leucocitos de secreción y elafina/trapina-2: versátiles antimicrobianos mucosales y reguladores de la inmunidad. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 Jun;42(6):635-43. Epub 2010 Abr 15.
- 35 Revisión.
- Sartor, R.B. 2004. Manipulación terapéutica de la microflora entérica en enfermedades inflamatorias intestinales: antibióticos, probióticos, y prebióticos. *Gastroenterología* 126:1620-1633.
- Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. Protección contra la salmonelosis entérica en ratones transgénicos que expresan una defensina intestinal humana. *Nature.* 2003 Abr 3;422(6931):522-6.
- 40 Simpson AJ, Maxwell AI, Govan JR, Haslett C, Sallenave JM. Elafina (inhibidor específico de la elastasa) tiene actividad anti-microbiana contra patógenos respiratorios gram-positivos y gram-negativos. *FEBS Lett.* 1999 Jun 11;452(3):309-13.
- Steidler, L., W.Hans, L.Schotte, S.Neirynck, F.Obermeier, W.Falk, W.Fiers, y E.Remaut, 2000. Tratamiento de la colitis murina por *Lactococcus lactis* que secreta interleuquina-10. *Science* 289:1352-1355.
- 45 Thierry Moreau, Kevin Baranger, Sebastien Dade, Sandrine Dallet-Choisy, Nicolas Guyot, Marie-Louise Zani. Papeles multifacéticos de la elafina humana y del inhibidor de la proteasa de leucocitos de secreción (SLPI), dos inhibidores de serina proteasa de la familia quelonianina. *Biochimie* 90 (2008) 284e295.
- Vergnolle, N. 2005. Relevancia clínica de los receptores activados por proteinasa en el intestino. *Intestino* 54:867-874.

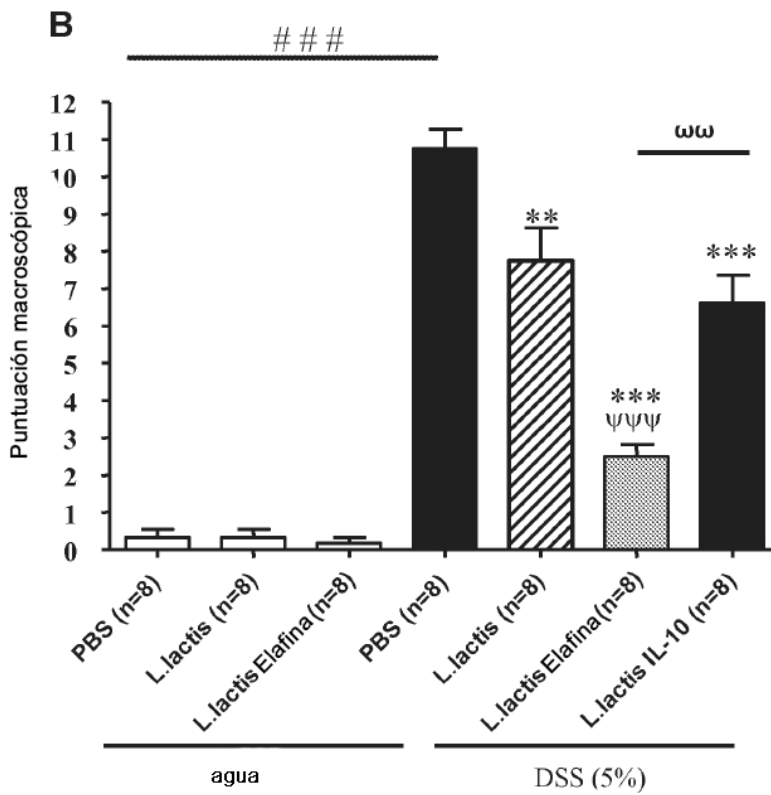
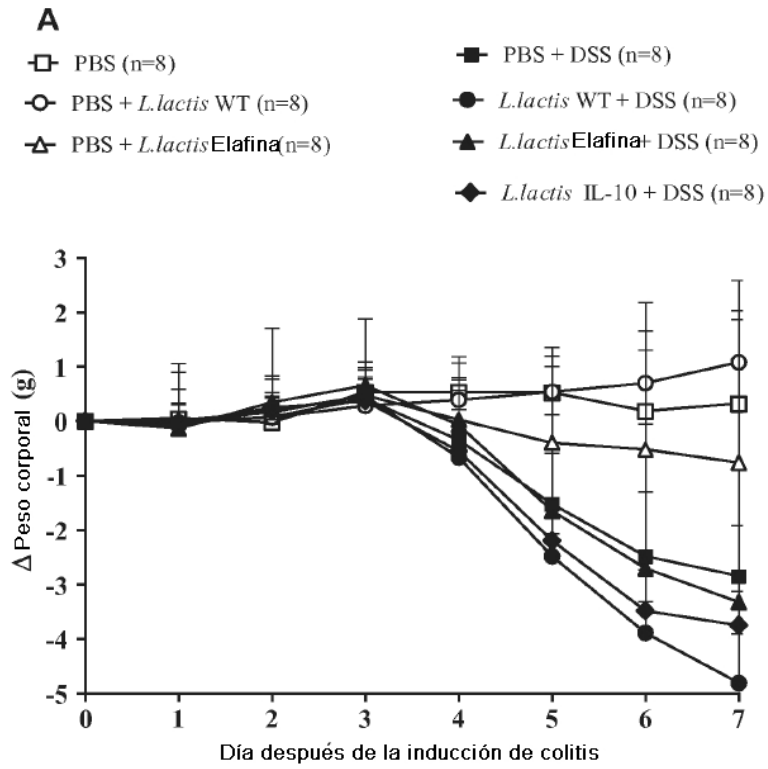
Vergnolle, N., L.Cellars, A.Mencarelli ,G.Rizzo, S.Swaminathan, P.Beck, M.Steinhoff, P.Andrade-Gordon, N.W.Bunnet, M.D.Hollenberg, J.L.Wallace, G.Cirino, y S.Fiorucci. 2004. Un papel para el receptor-1 activado por la proteinasa en enfermedades inflamatorias intestinales. J Clin Invest 114:1444-1456.

**LISTA DE SECUENCIAS**

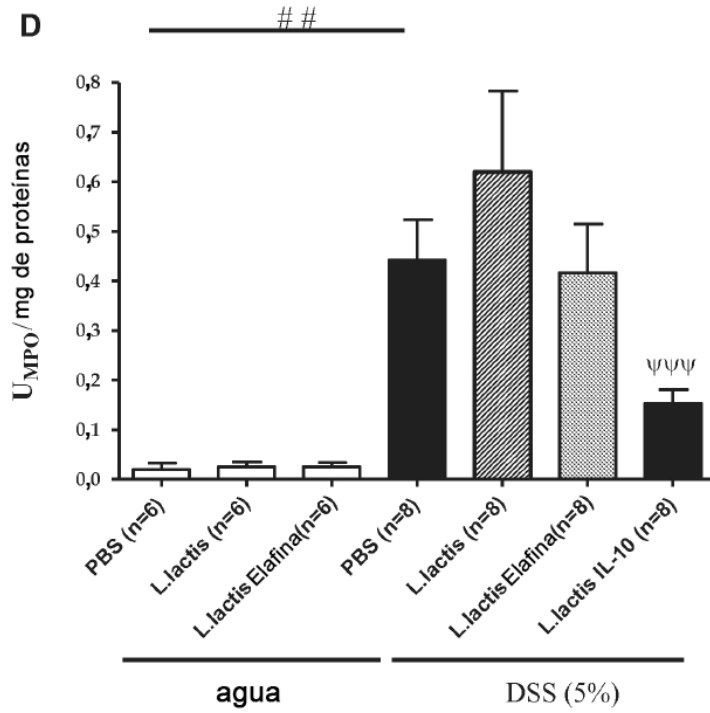
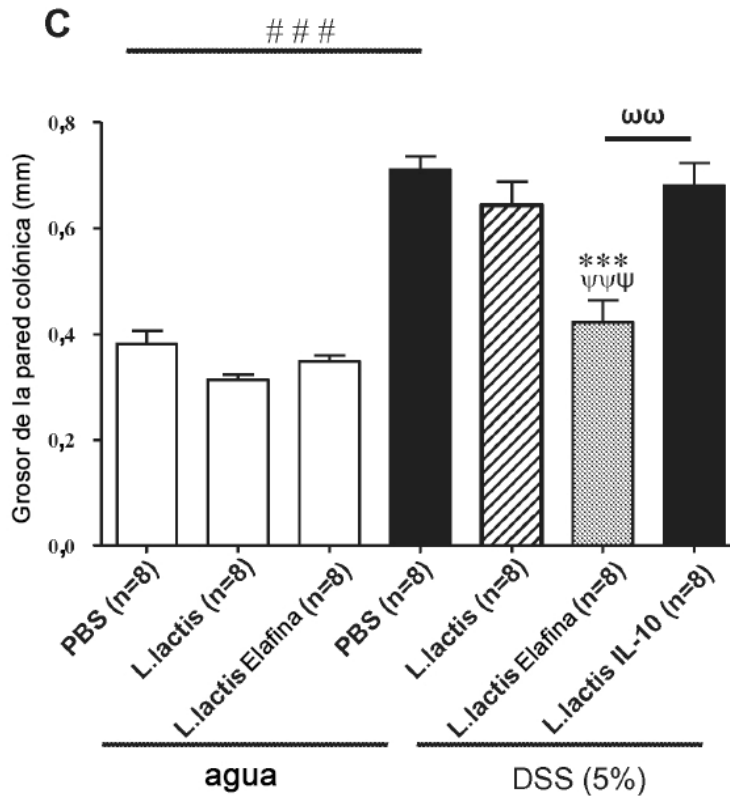
- <110> INSERM
- 5 <120> Bacteria probiótica recombinante para la prevención y tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) y del Síndrome del Intestino Irritable (SII).
- <130> VERGNOLL09139NC
- 10 <140> EP10305045.6  
<141> 14-01-2010
- <160> 2
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 31
- <212> ADN
- 20 <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador
- 25 <400> 1  
ccaatgcatc agcagctgtc acgggagttc c 31
- <210> 2
- <211> 32
- <212> ADN
- 30 <213> Artificial
- <220>
- <223>Cebador
- 35 <400> 2  
ggactagtcc tcactgggga acgaaacagg cc 32
- 40

**REIVINDICACIONES**

1. Una Bacteria Ácido Láctica recombinante de calidad alimentaria que comprende un gen recombinante que codifica para la proteína elafina o una fracción activa de la proteína elafina.
- 5 2. Una Bacteria Ácido Láctica recombinante de calidad alimentaria según la reivindicación 1, en donde la Bacteria Ácido Láctica comprende un gen auxótrofo defectuoso, en la cual la supervivencia de dicha Bacteria Ácido Láctica es estrictamente dependiente de la presencia de compuestos específicos.
3. Una Bacteria Ácido Láctica recombinante de calidad alimentaria según la reivindicación 2, en donde el gen auxótrofo defectuoso es *thyA*.
- 10 4. Una Bacteria Ácido Láctica recombinante de calidad alimentaria según la reivindicación 3, en donde el gen seleccionado se inserta en el lugar del gen auxótrofo defectuoso.
5. Una Bacteria Ácido Láctica recombinante de calidad alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 seleccionada de *Bifidobacterium*, *Lactococcus lactis* o *Lactobacillus*.
- 15 6. Una Bacteria Ácido Láctica recombinante de calidad alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 seleccionadas de *Lactococcus lactis htrA*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, y *Bifidobacterium longum*.
7. Una Bacteria Ácido Láctica recombinante de calidad alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el uso en el tratamiento del Síndrome del Intestino Irritable.
8. Una Bacteria Ácido Láctica recombinante de calidad alimentaria para el uso según la reivindicación 7, en donde la composición se destina para la administración oral o rectal a un sujeto.
- 20 9. Una composición terapéutica que comprende una Bacteria Ácido Láctica recombinante de calidad alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Una composición terapéutica según la reivindicación 9, en donde la composición se destina para la administración oral o rectal a un sujeto.

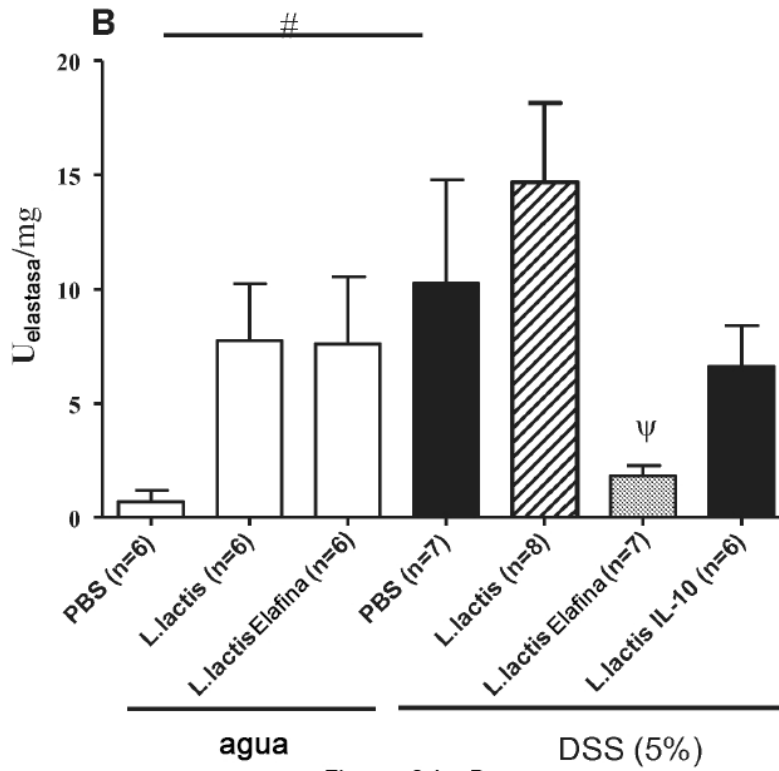
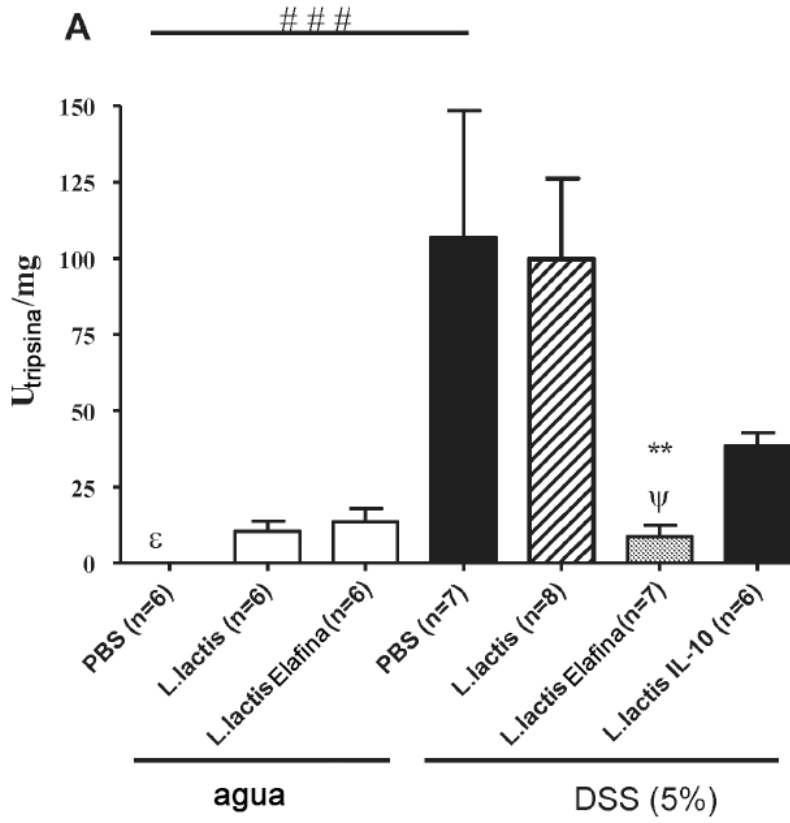


Figuras 1 A y B

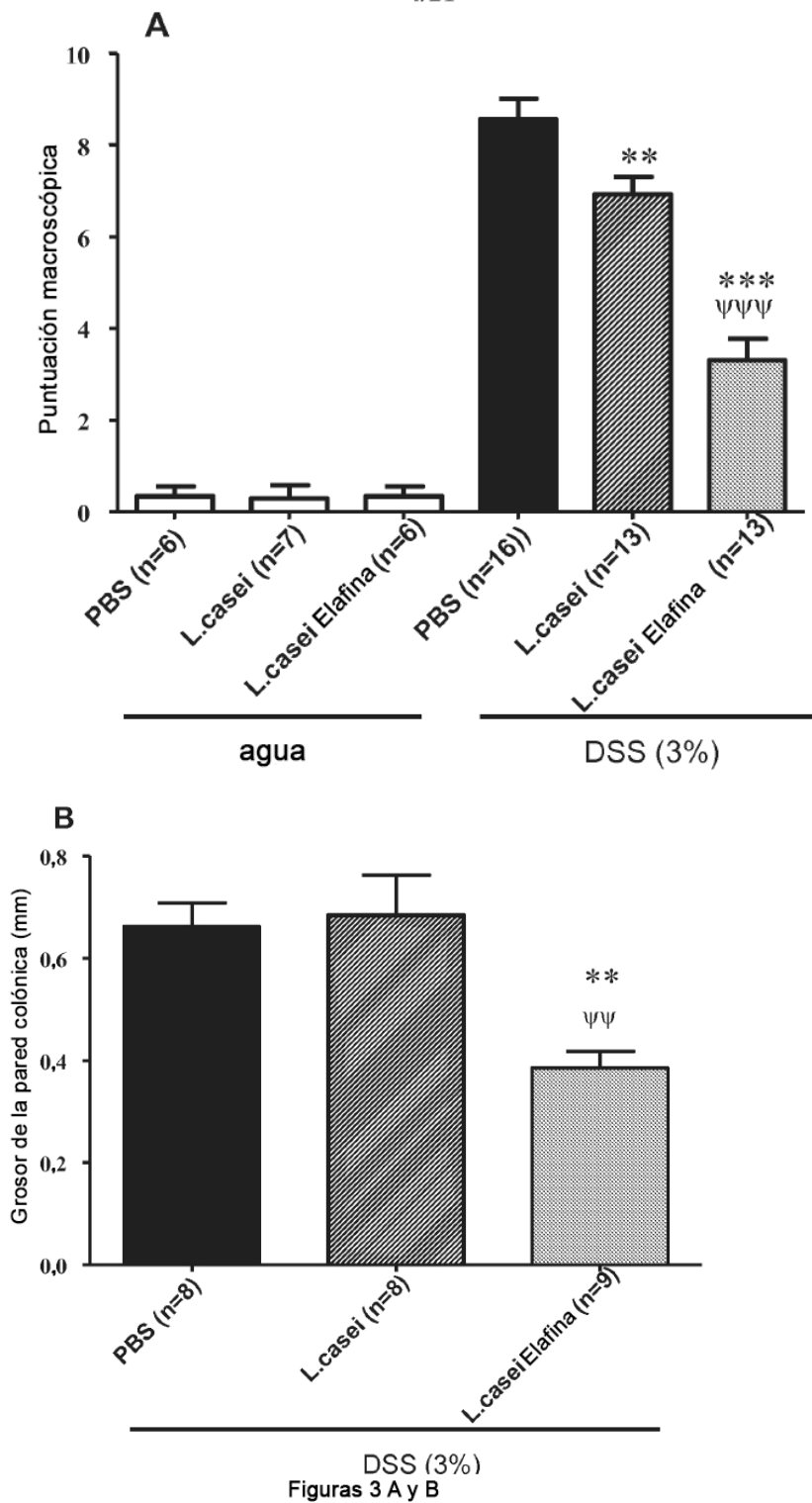


Figuras 1 C y D





Figuras 2 A y B



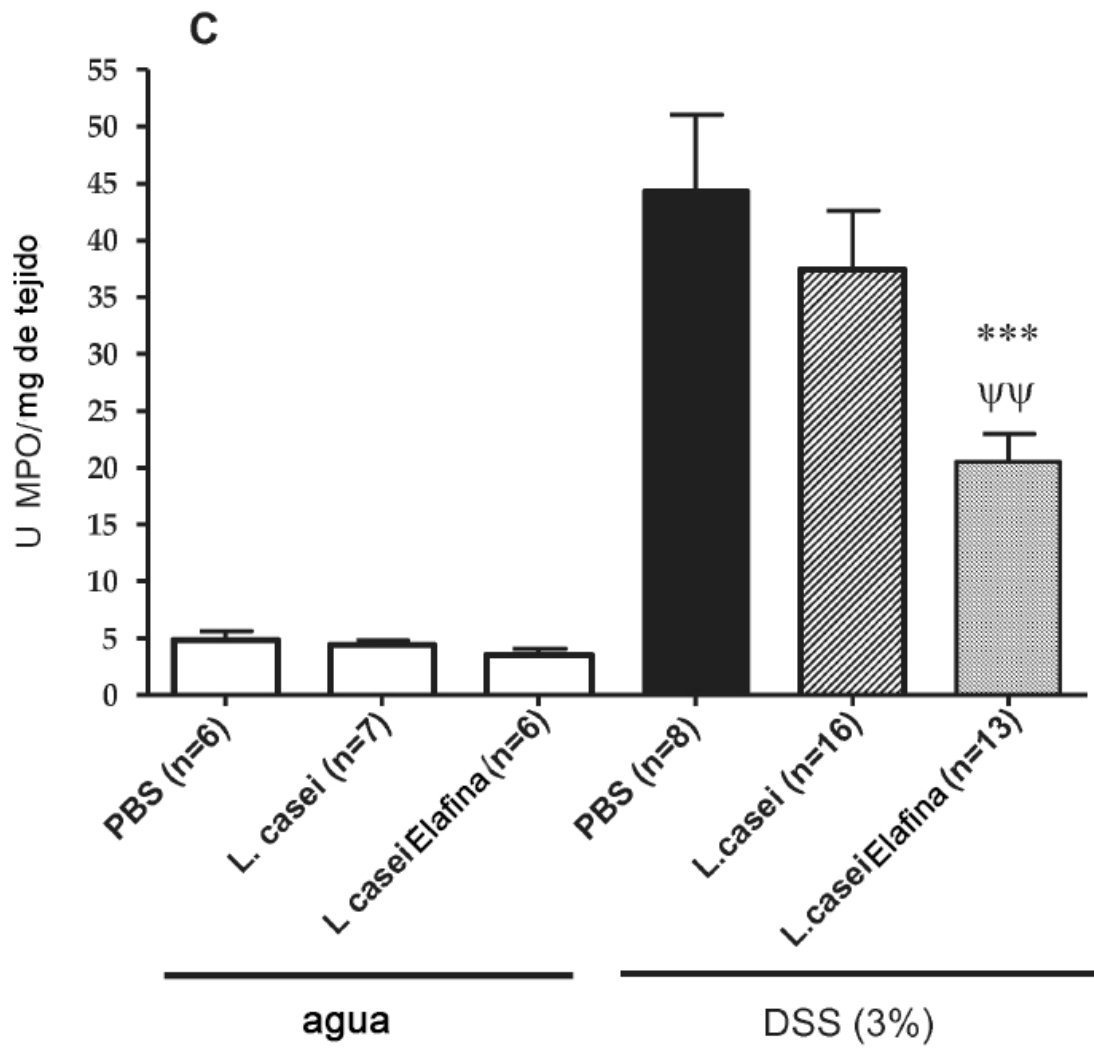
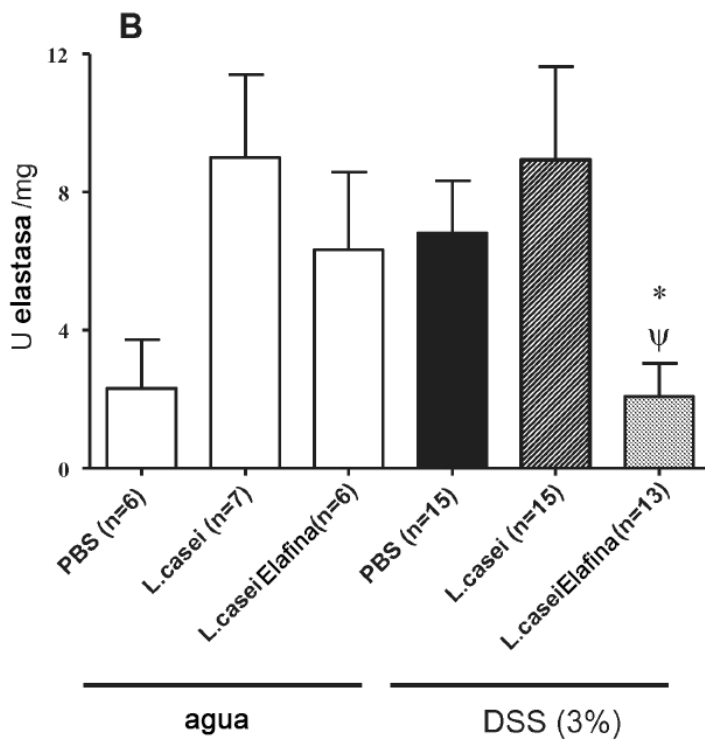
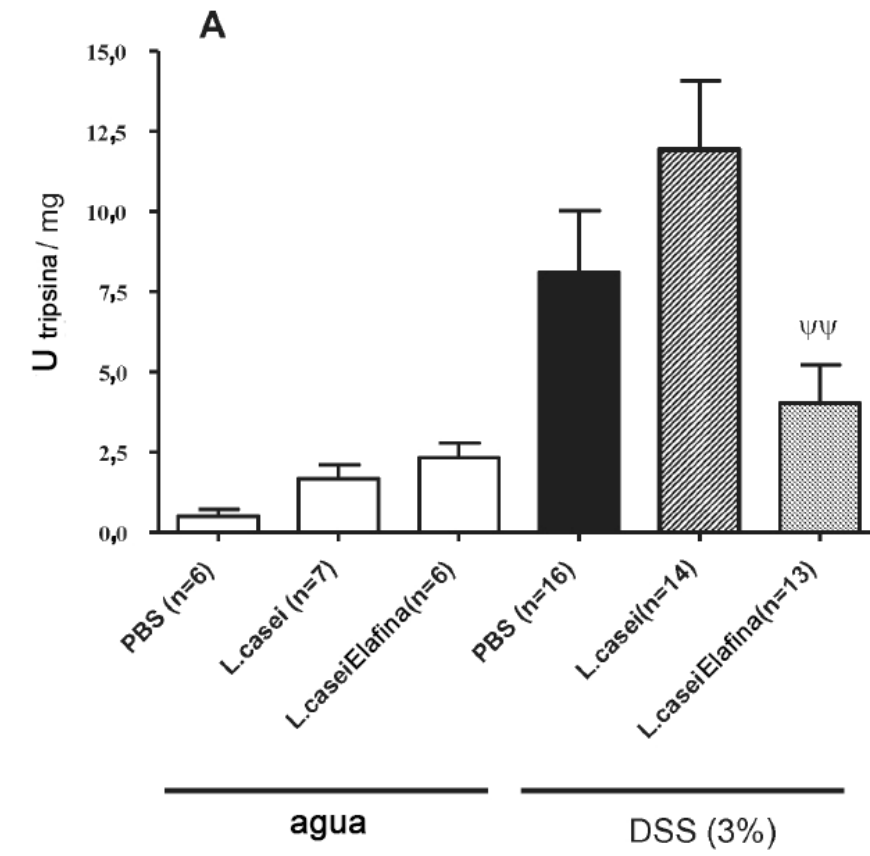
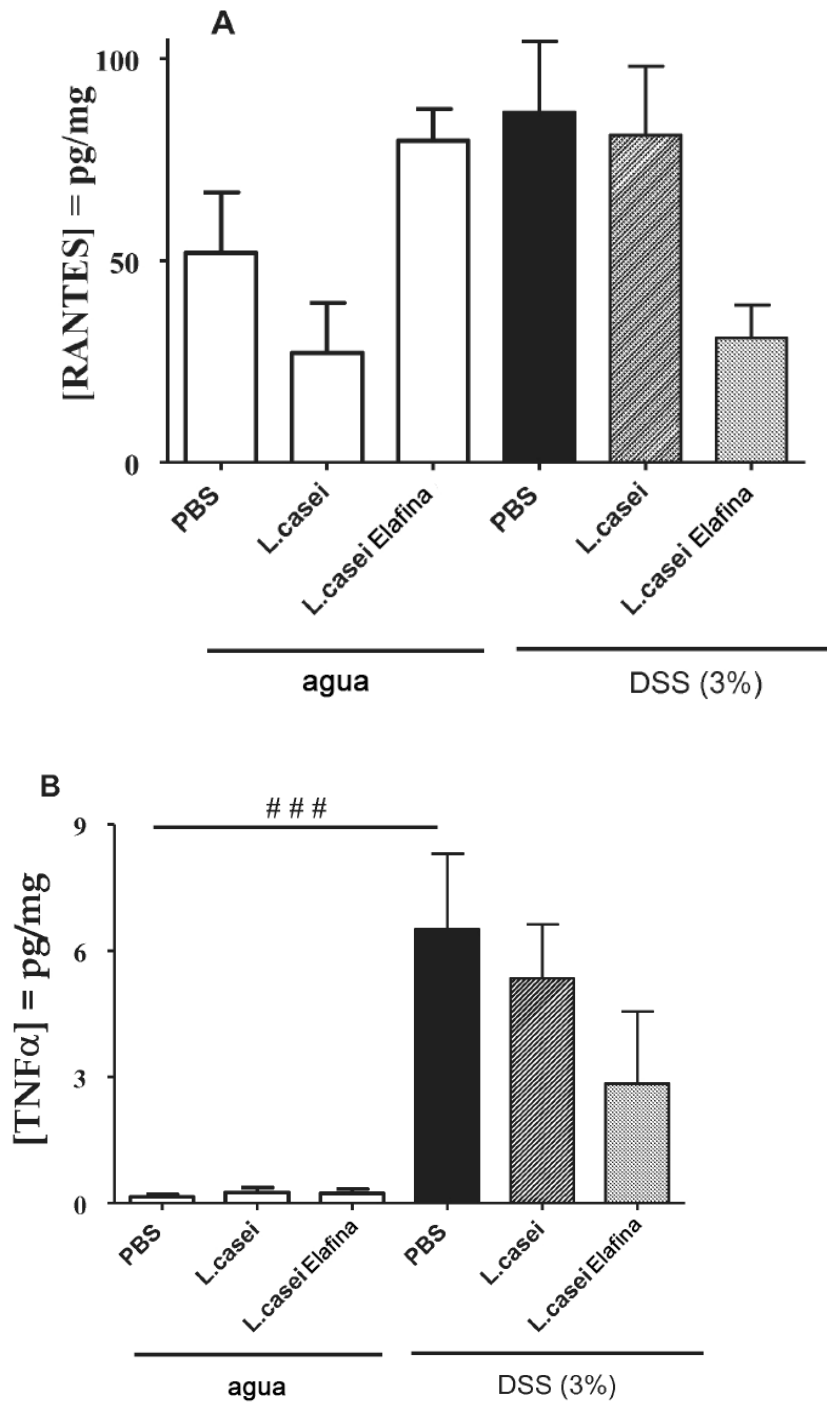


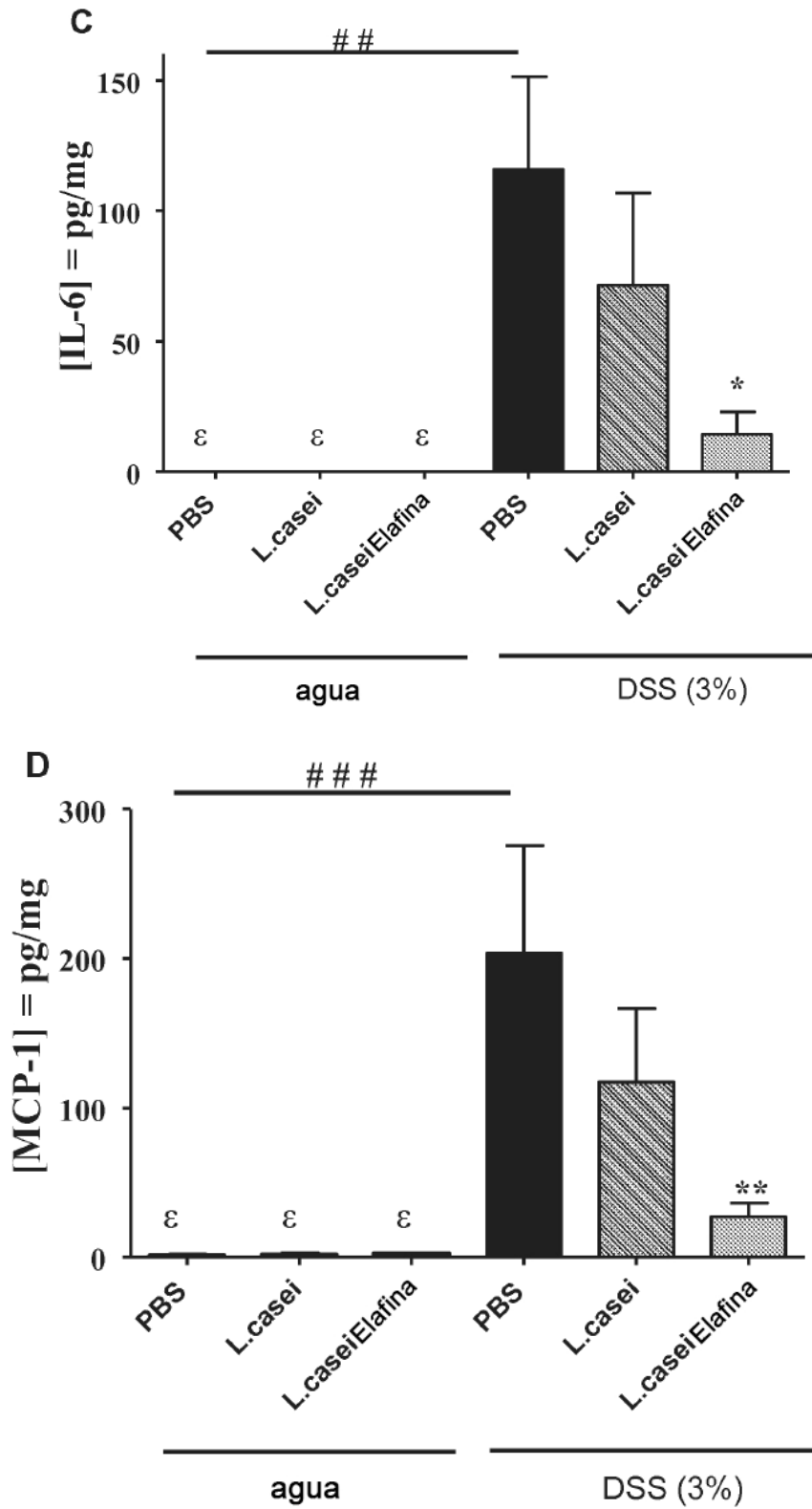
Figura 3 C



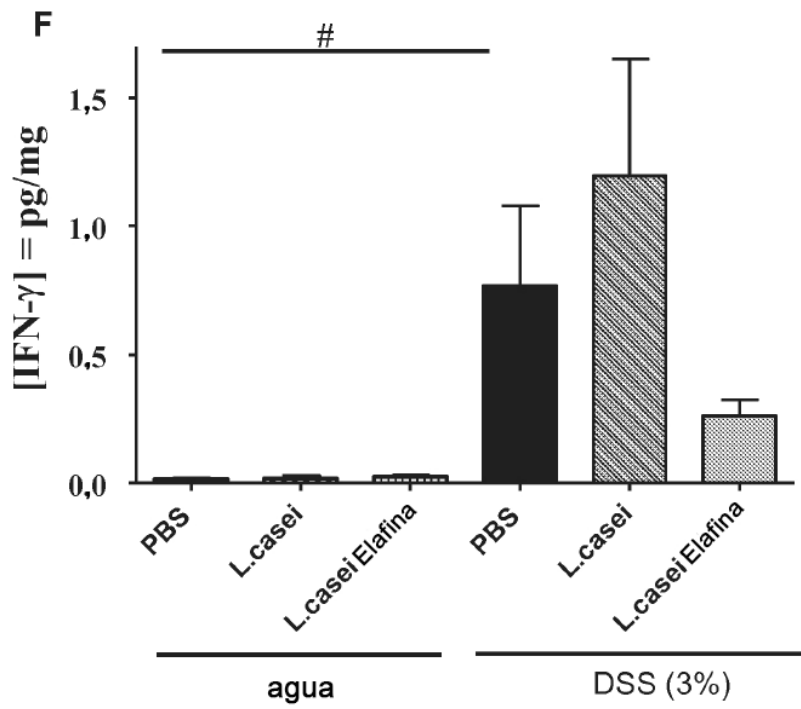
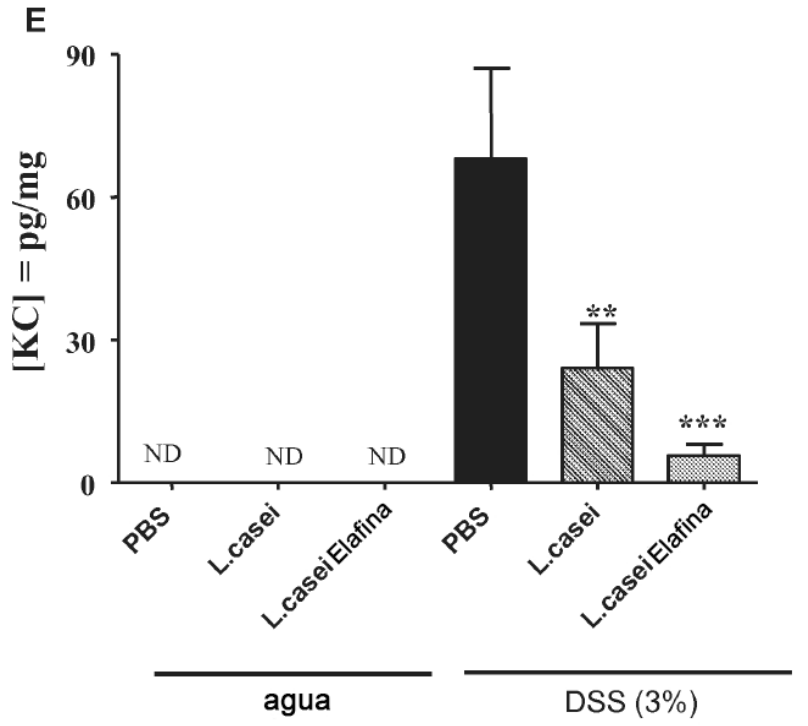
Figuras 4 A y B



Figuras 5 A y B



Figuras 5 C y D



Figuras 5 E y F

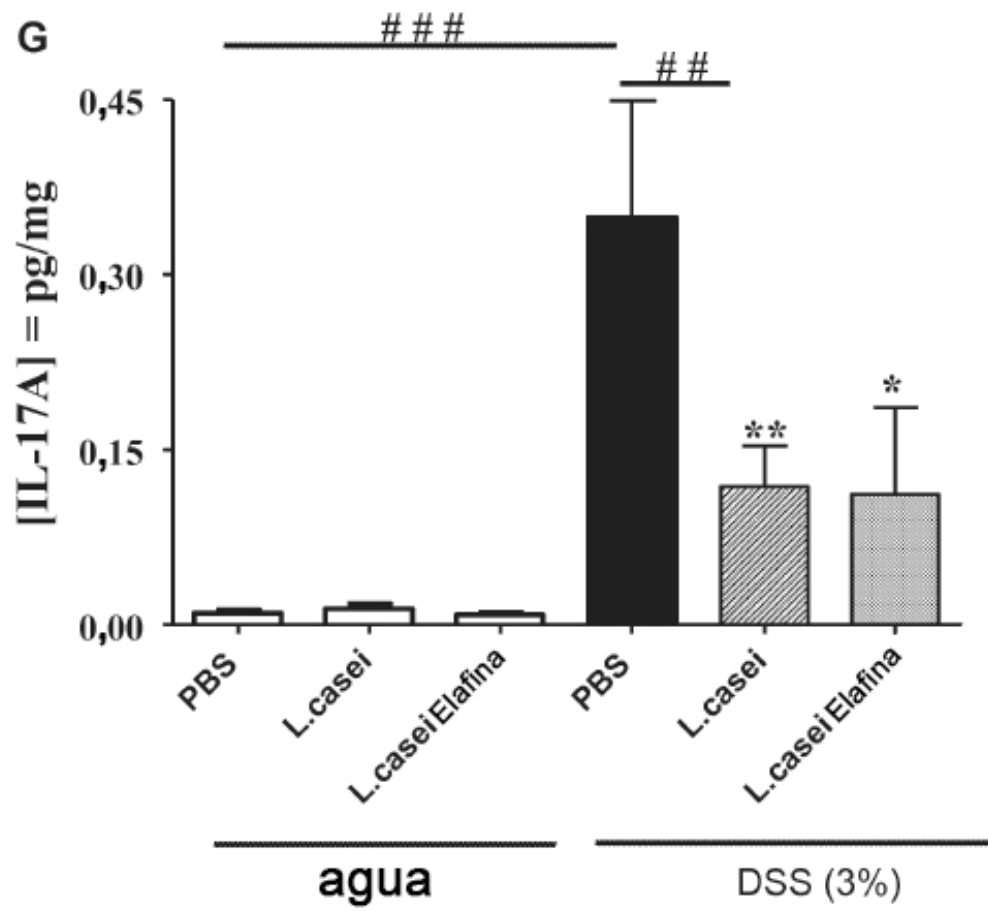
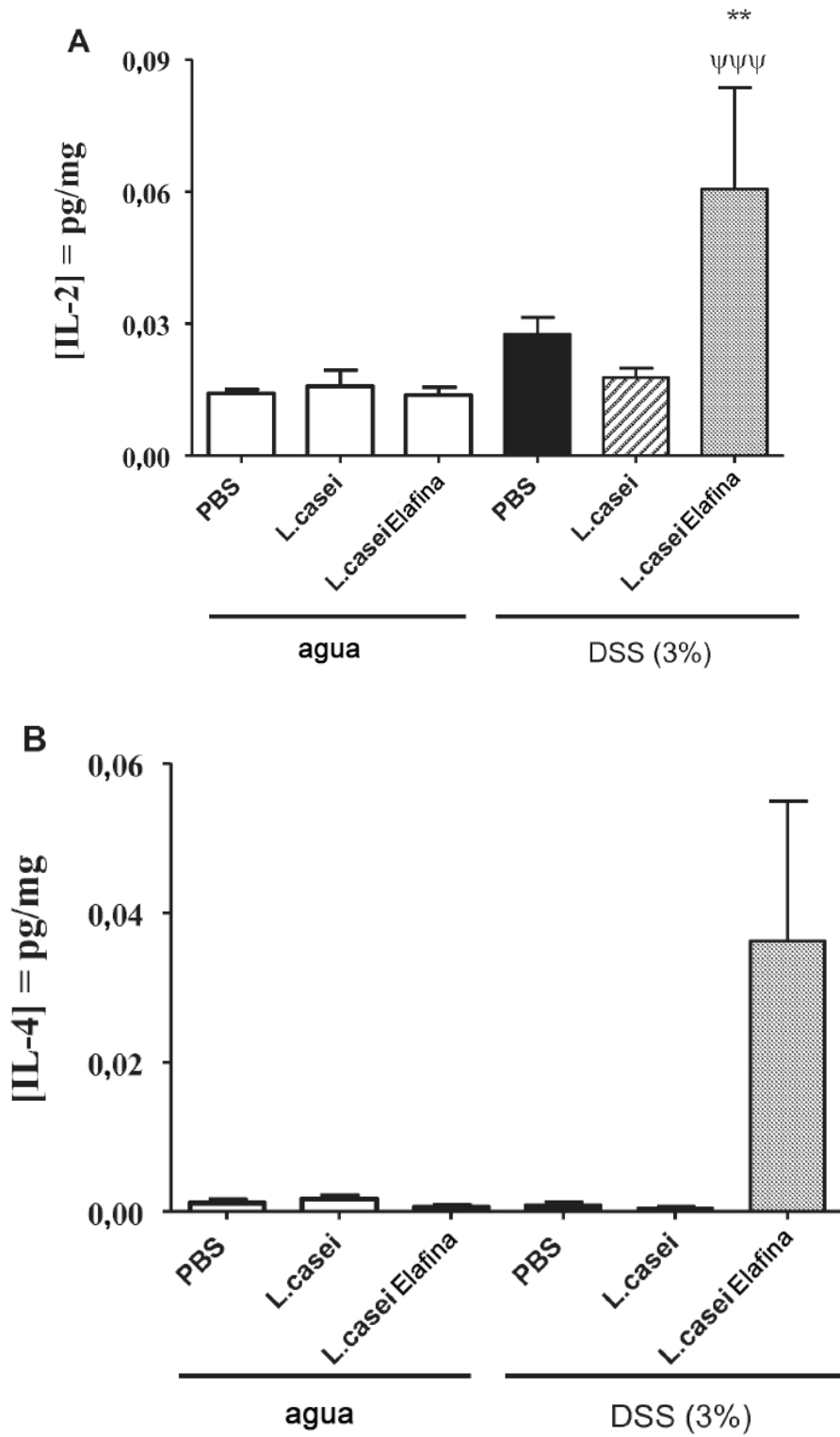
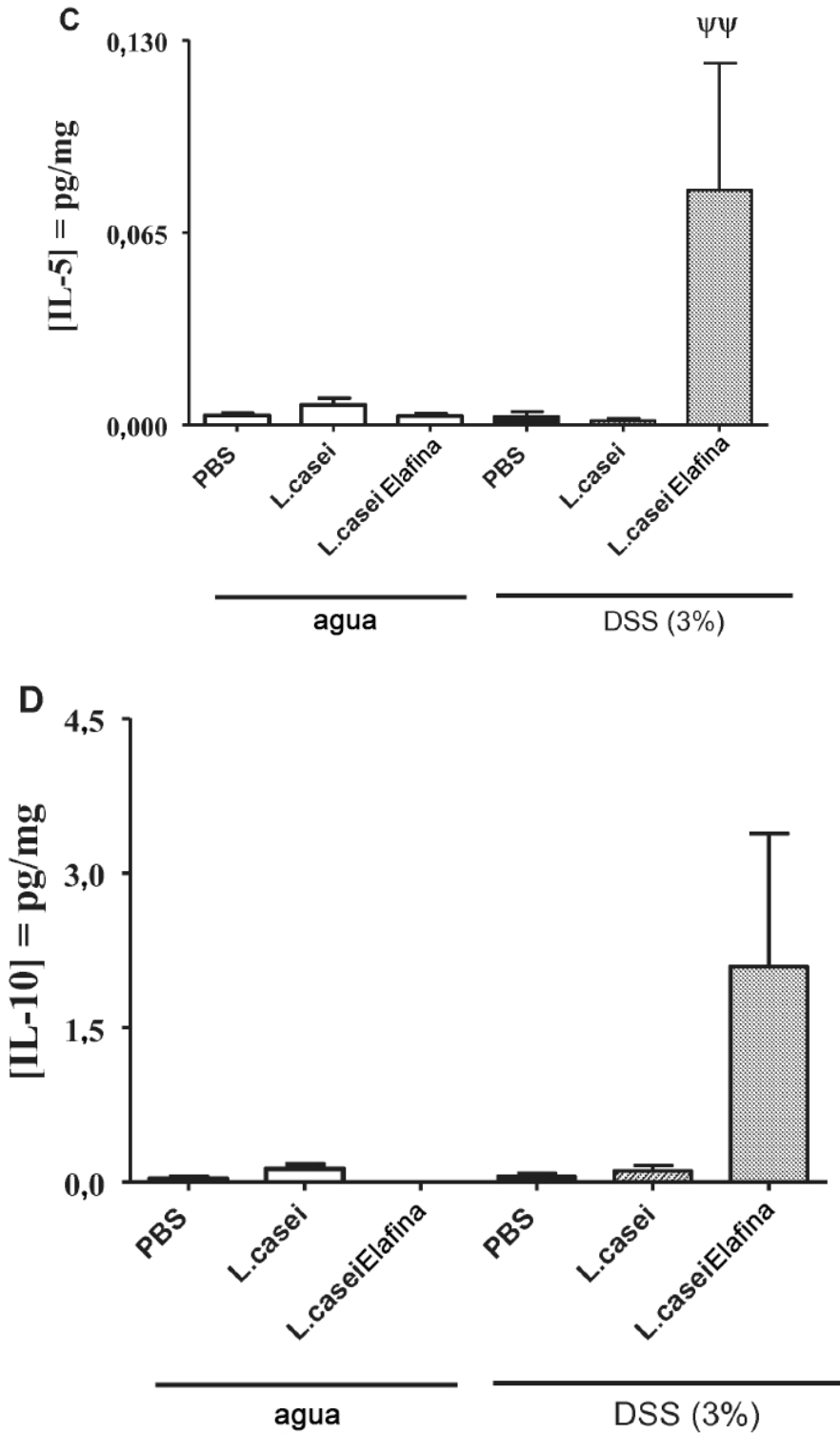


Figura 5 G







Figuras 6 C y D

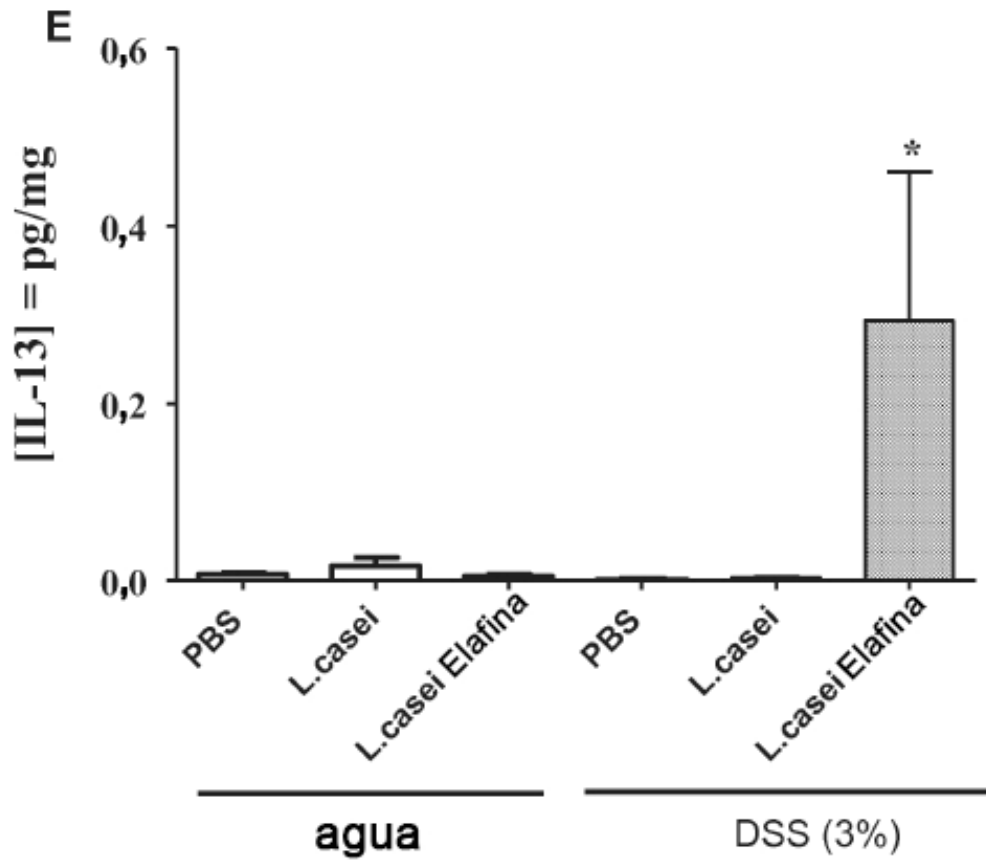
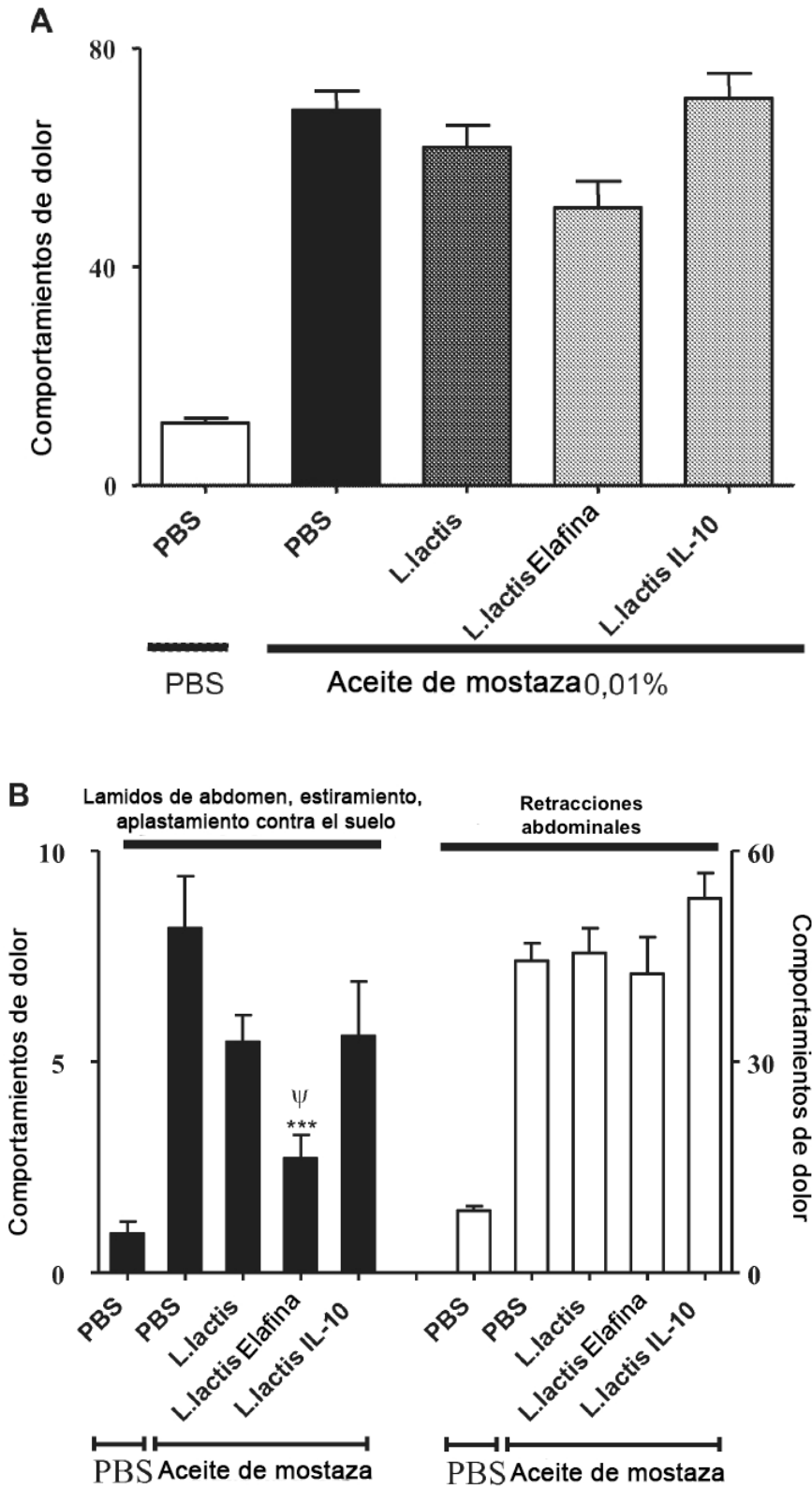


Figura 6E



Figuras 7 A y B

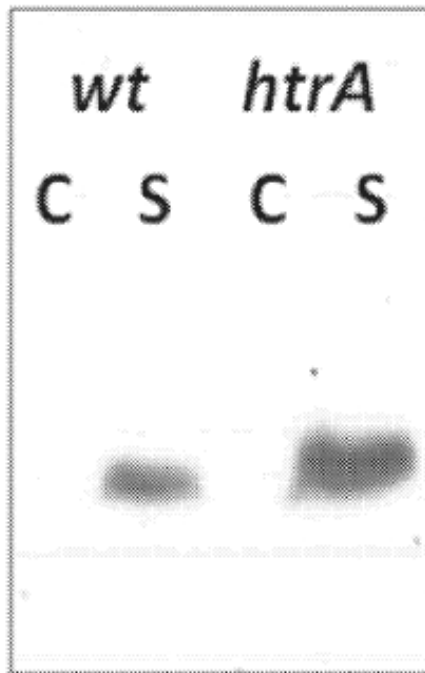
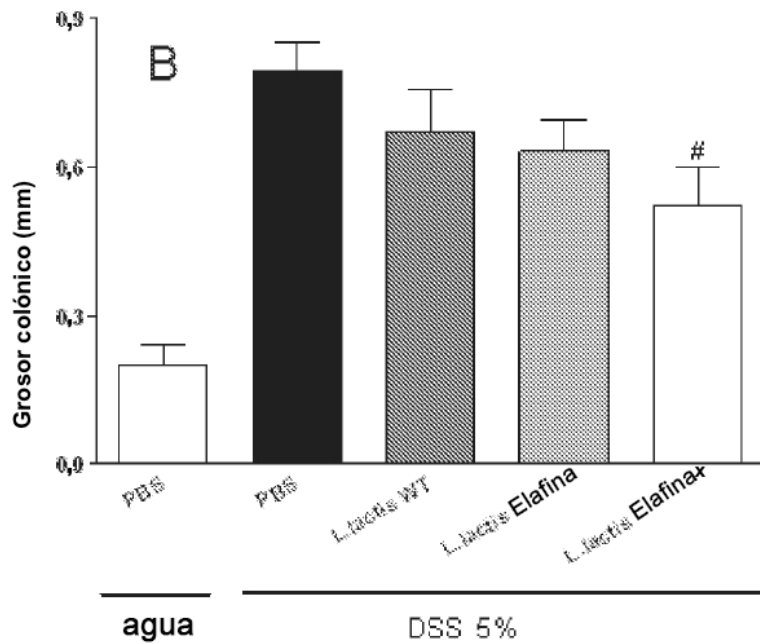
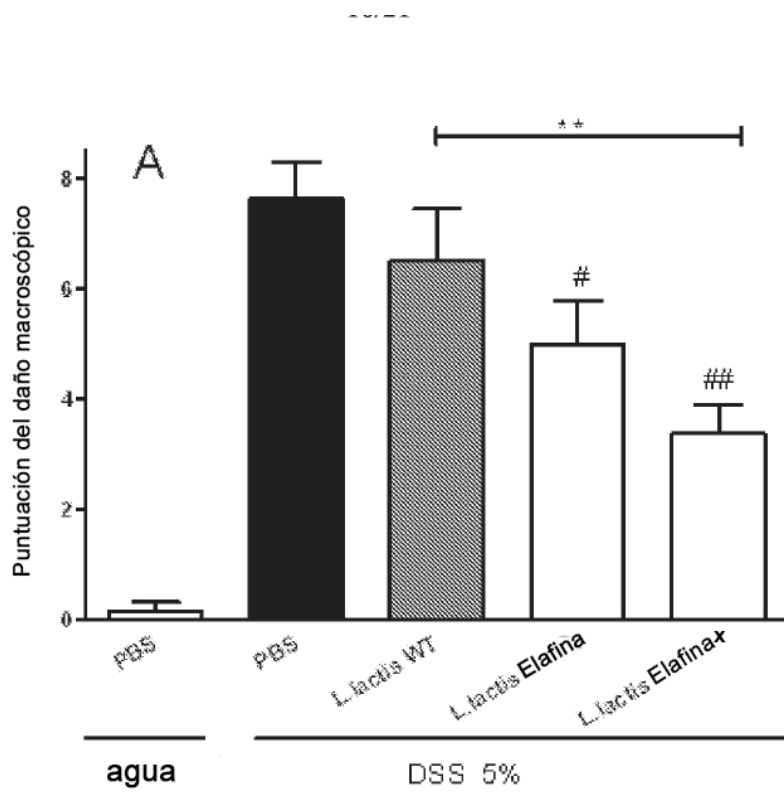


Figura 8



Figuras 9 A y B

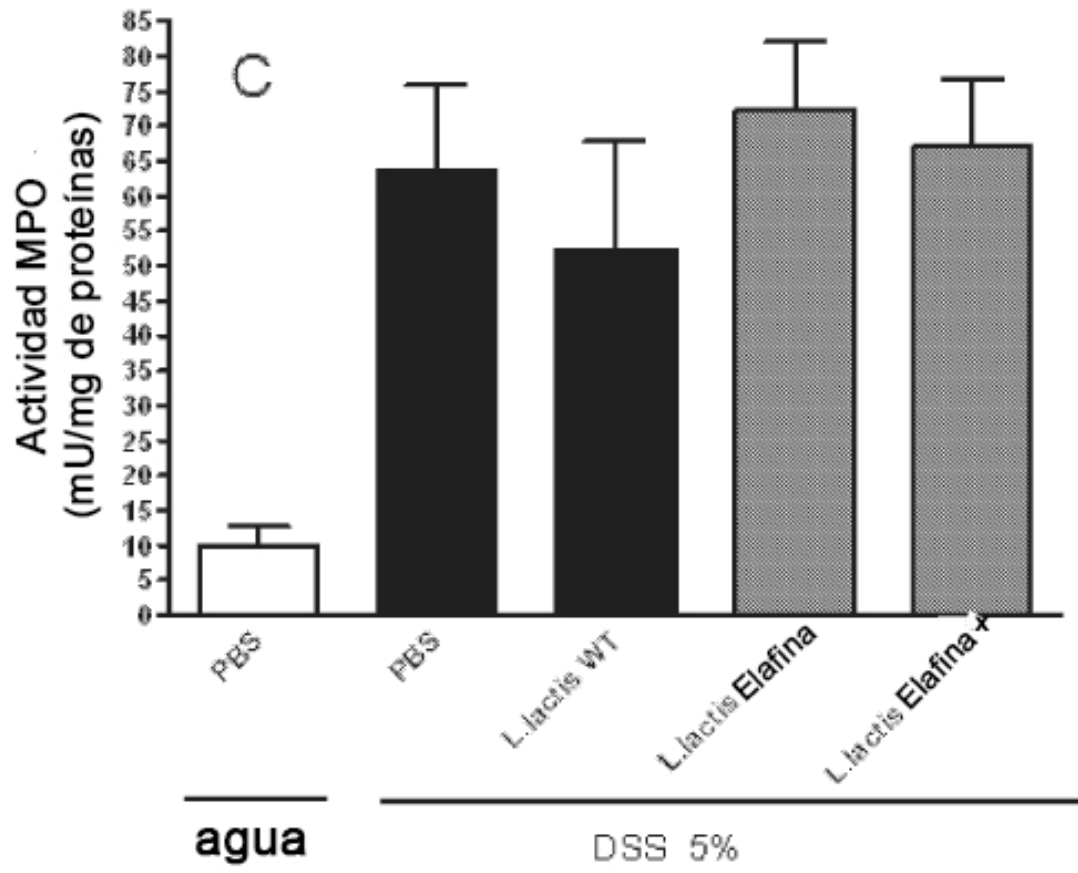
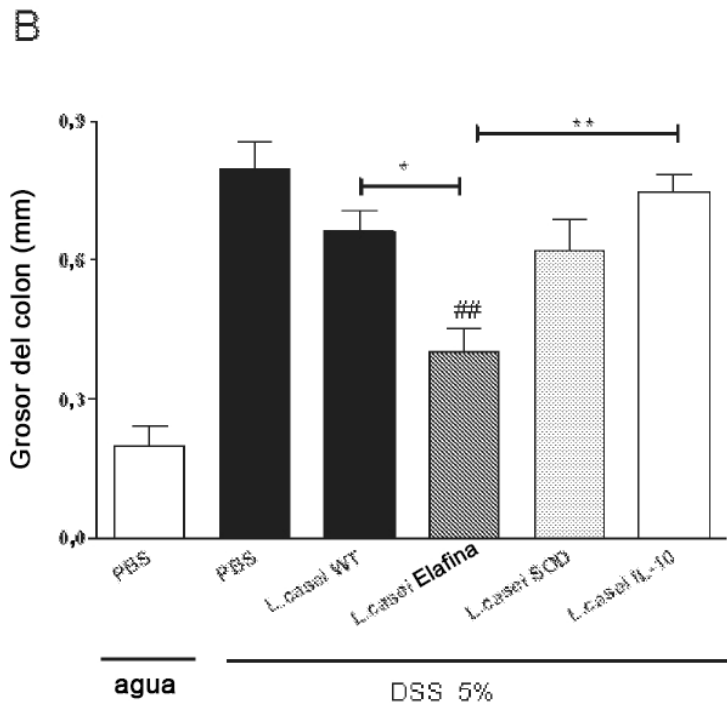
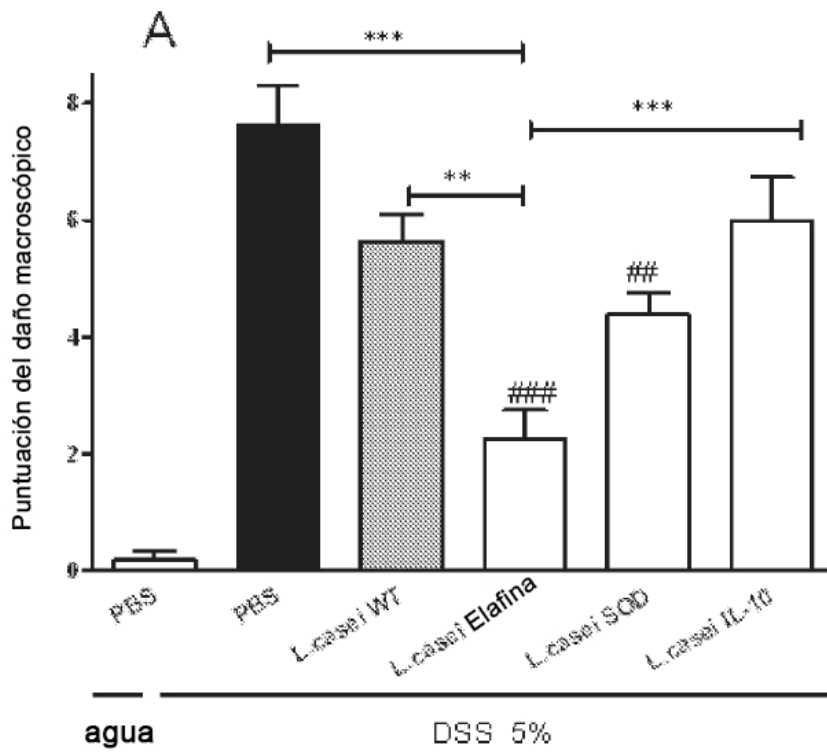


Figura 9 C



Figuras 10 A y B



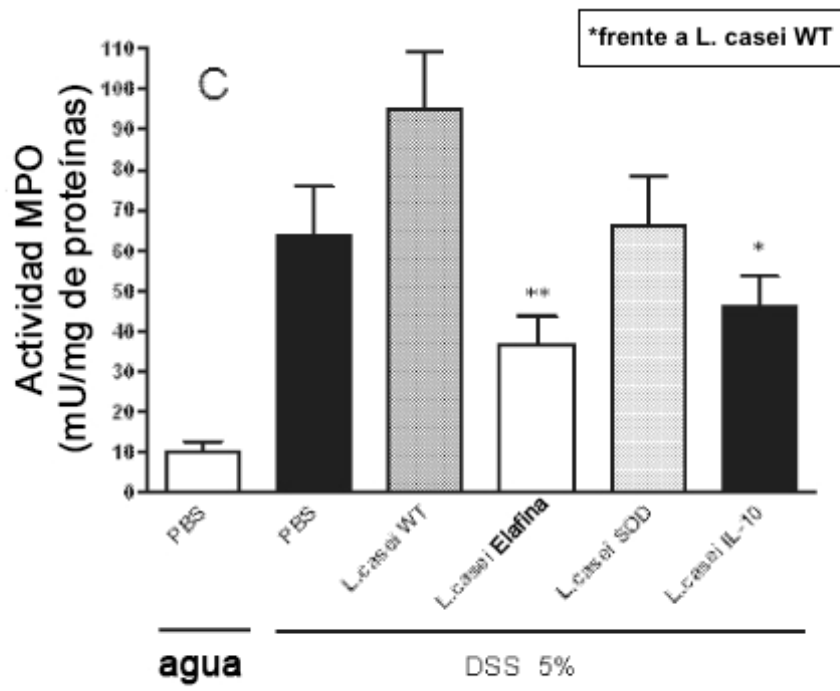


Figura 10 C

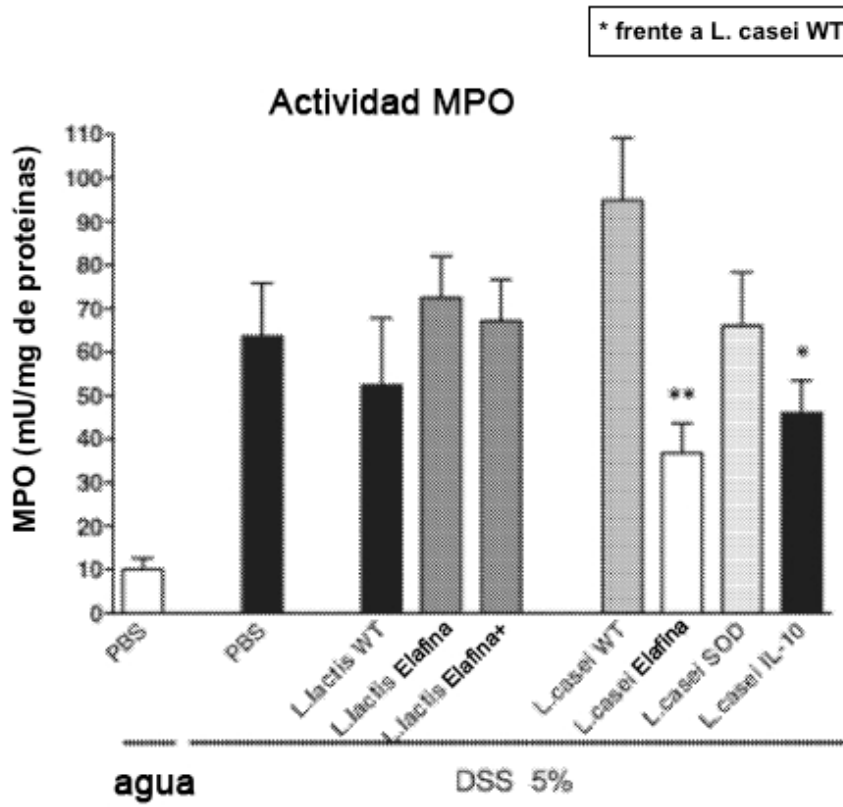


Figura 11

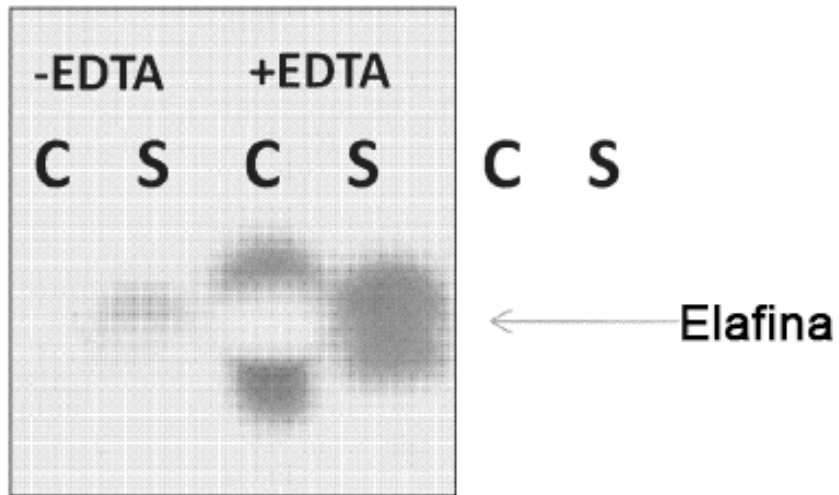


Figura 12