

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 610**

51 Int. Cl.:

A61K 35/744 (2015.01)

A61K 36/064 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2006 PCT/EP2006/065803**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2007 WO07025977**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2006 E 06778386 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 1948206**

54 Título: **Bacterias de ácido láctico productoras del anti-TNF alfa para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal**

30 Prioridad:

30.08.2005 EP 05107909
02.12.2005 EP 05111654

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2017

73 Titular/es:

INTREXON ACTOBIOTICS NV (100.0%)
Technologiepark 4
9052 Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

ROTTIERS, PIETER y
VANDENBROUCKE, KLAAS

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

Observaciones :

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

ES 2 626 610 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

Bacterias de ácido láctico productoras del anti-TNF alfa para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal

5 La presente invención se refiere a un nuevo tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Más específicamente, la invención se refiere a la producción de un medicamento que comprende bacterias de ácido láctico productoras de anti-TNF α , y al uso de este medicamento en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) se refiere a un grupo de trastornos gastrointestinales caracterizados por una inflamación crónica no específica de porciones del tracto gastrointestinal. Los ejemplos más destacados de IBD en humanos son la colitis ulcerosa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD). La etiología o las etiologías de IBD no están claras. Las enfermedades de IBD parecen resultar de la activación sin restricciones de una respuesta inflamatoria en el intestino. Se cree que esta cascada inflamatoria se perpetúa a través de acciones de citoquinas proinflamatorias y activación selectiva de subconjuntos de linfocitos. UC y CD están asociadas con muchos síntomas y complicaciones, incluyendo retardo de crecimiento en niños, prolapso rectal, sangre en las heces, emaciación, deficiencia de hierro y anemia. UC se refiere a una enfermedad crónica, no específica, inflamatoria y ulcerosa que tiene manifestaciones principalmente en la mucosa colónica. Se caracteriza frecuentemente por diarrea sanguinolenta, calambres abdominales, sangre y moco en heces, malestar, fiebre, anemia, anorexia, pérdida de peso, leucocitosis, hipoalbuminemia y una elevada tasa de sedimentación de eritrocitos.

20 La enfermedad de Crohn comparte muchas características en común con la colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn se distingue por el hecho de que las lesiones tienden a ser marcadamente delimitadas del intestino adyacente normal, en contraste con las lesiones de colitis ulcerosa que son bastante difusas. Además, la enfermedad de Crohn afecta predominantemente al íleon (ileitis) y al íleon y al colon (ileocolitis). En algunos casos, el colon solo está enfermo (colitis granulomatosa) y a veces todo el intestino delgado está involucrado.

25 El cáncer de colon es una complicación conocida de la IBD crónica. Es cada vez más común en los pacientes que tienen IBD durante muchos años. El riesgo de cáncer comienza a aumentar significativamente después de ocho a diez años de IBD, haciendo un tratamiento rápido y eficiente de la IBD aún más importante. La medicación más comúnmente usada para tratar IBD incluye fármacos antiinflamatorios tales como corticosteroides y sulcilatos tales como sulfasalazina y sus derivados. Para las personas que no responden a estos fármacos, se utilizan fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina A, mercaptopurina y azatropina. Sin embargo, estos medicamentos tienen efectos secundarios graves. Un desarrollo reciente y exitoso en el tratamiento de la IBD consiste en el uso de compuestos que bloquean el funcionamiento del TNF o su receptor. En este sentido, el uso de anticuerpos contra TNF es una de las nuevas terapias más prometedoras. El factor de necrosis tumoral α (TNF α) es una citoquina producida por numerosos tipos celulares, incluyendo monocitos y macrófagos, que se identificó originalmente en base a su capacidad para inducir la necrosis de ciertos tumores de ratón (véase, por ejemplo, Old, L. (1985) Science 230:630-632). TNF α ha sido implicado en la fisiopatología de una variedad de otras enfermedades y trastornos humanos, incluyendo sepsis, infecciones, enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplante y enfermedad de injerto contra huésped (véase, por ejemplo, Moeller, A. et al. (1990) Cytokine2:162-169; la Patente de los Estados Unidos No. 5,231,024 de Moeller et al; Publicación de la Patente Europea No. 260 610 (B1) de Moeller, A. et al.; Vasilli. P. (1992) Annu. Rev.Immunol. 10:411-452; Tracey, K.J. and Cerami, A. (1994) Annu. Rev. Med. 45:491-503). Debido al papel nocivo del TNF α humano (hTNF α) en una variedad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad de hTNF α . En particular, se han buscado anticuerpos que se unen a, y neutralizan, hTNF α como un medio para inhibir la actividad de hTNF α .

45 Se han ensayado varias preparaciones de anticuerpo para el tratamiento de IBD. Aunque se han ensayado anticuerpos policlonales en ensayos clínicos de fase II, se prefieren claramente los anticuerpos monoclonales. Infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico humano-ratón de la subclase IgG1K, que se dirige específicamente y se une irreversiblemente al TNF α en las membranas celulares y en la sangre. Las dosis intravenosas únicas, que oscilaban desde 5 a 20 mg/kg del anticuerpo infliximab, dieron como resultado una drástica mejora clínica de la enfermedad de Crohn activa; se ha lanzado en el mercado para tratar la enfermedad de Crohn en 1998.

50 Para resolver posibles problemas relacionados con anticuerpos quiméricos, se desarrolló el adalimumab de TNF α monoclonal humano, que se ensaya actualmente en ensayos clínicos de fase III para el tratamiento de Crohn. Para mejorar el tiempo de semivida del anticuerpo en los pacientes, Celltech desarrolló Certolizumab pegol, que es un anticuerpo anti-TNF α monoclonal pegilado humanizado, que actualmente también se prueba en ensayos clínicos de fase III para el tratamiento de Crohn.

55 Sin embargo, en todos estos casos, los anticuerpos se aplican de forma sistémica, principalmente por inyección subcutánea. La administración sistémica del anticuerpo anti TNF- α puede producir efectos no deseados bastante graves, incluyendo dolor de cabeza, abscesos, infección del tracto respiratorio superior y fatiga.

Los efectos no deseados asociados con la administración sistémica se podrían resolver mediante administración local en el lugar de la inflamación. En el documento WO97/14806 se ha descrito un sistema prometedor para la administración de compuestos activos biológicos en el intestino, por lo que se usan bacterias grampositivas no invasivas tales como bacterias de ácido láctico para administrar compuestos activos biológicos en el intestino. El documento WO00/23471 describe que este sistema se puede usar para administrar IL-10 al íleon, por lo que esta cepa se puede usar para tratar IBD. El documento WO01/98461 describe un método alternativo para la administración intestinal usando levadura. Sin embargo, aunque se describe la administración de compuestos biológicamente activos, estos documentos no enseñan la administración de anticuerpos en el intestino. El documento WO04/041862 muestra que microorganismos genéticamente modificados tales como *Micrococcus lactis* son capaces de secretar polipéptidos anti-TNF alfa o porciones funcionales de los mismos y se pueden utilizar como vehículos para la producción local y la administración de anticuerpos en el intestino. La producción in situ de anticuerpos activos en el intestino está lejos de ser sencilla, ya que tanto el plegamiento como la secreción del anticuerpo son críticos. Especialmente, la estabilización de la estructura por puentes de azufre puede causar problemas para la producción de anticuerpos en bacterias o levaduras. Además, mientras que las citocinas como la IL-10 cumplen una función catalítica, los anticuerpos del TNF deben producirse en una cantidad suficiente para inactivar el TNF producido endógenamente. Sorprendentemente, se encontró que la administración local de anticuerpo anti-TNF- α por *Lactococcus lactis* se puede utilizar de una manera eficaz para tratar IBD.

Un primer aspecto de la invención es el uso de un *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α para la preparación de un medicamento para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), en el que una cantidad eficaz de dicho *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α se debe administrar al tracto gastrointestinal. El término anticuerpo, como se usa en este documento, incluye, pero no se limita a anticuerpos convencionales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos bifuncionales, anticuerpos bivalentes, diacuerpos y anticuerpos de camélidos, incluyendo fragmentos de anticuerpos tales como VHHs; Preferiblemente dicho anticuerpo es un anticuerpo bivalente. Los anticuerpos bivalentes tienen la ventaja de inhibir la unión del TNF a su receptor, de una manera significativamente más eficiente que la monovalente (EC50 = 16 pM y 6.7 nM, respectivamente). Sorprendentemente, encontramos que la producción de anticuerpos bivalentes en *Lactococcus* es tan alta o incluso mayor que la de anticuerpos monovalentes.

La liberación de polipéptidos biológicamente activos en el cuerpo animal por bacterias de ácido láctico se ha descrito en el documento WO9714806; la administración intestinal de péptidos por levadura se ha descrito en el documento WO0198461. Sin embargo, ninguno de estos documentos menciona la administración de anticuerpos o nanocuerpos en el intestino. La producción, secreción y administración in vivo de anticuerpos activos biológicos o nanocuerpos está lejos de ser evidente, ya que se requiere un plegado y secreción correctos del anticuerpo, y se requiere suficiente anticuerpo para obtener una actividad neutralizante.

El *Lactococcus lactis* puede ser un mutante ThyA de *Lactococcus lactis* tal como un mutante ThyA de *Lactococcus lactis*, por lo que el gen que codifica el anticuerpo TNF- α se ha utilizado para interrumpir el gen THYA.

En este documento se describe el uso de una levadura para administrar el anticuerpo anti TNF- α .

Dicha levadura puede ser *Saccharomyces cerevisiae*, tal como *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *Bouardii*.

La IBD, como se utiliza en este documento, incluye, pero no se limita a, colitis crónica, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Preferiblemente, la IBD es colitis crónica.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica para administración oral, que comprende al menos un *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α . Preferiblemente, dicho VHH anti-TNF α es un anticuerpo bivalente. La composición farmacéutica puede ser líquida, que comprende microorganismos activos biológicos, o puede ser sólida, que comprende microorganismos secos que pueden reactivarse cuando se ponen en un entorno apropiado. Los microorganismos se pueden secar por cualquier sistema, incluyendo liofilización y secado por pulverización. La expresión "producción de VHH anti-TNF α " como se utiliza en este documento no implica que el microorganismo esté produciendo el VHH en la composición farmacéutica, pero significa que el microorganismo es viable y puede producir el VHH cuando se coloca en un entorno apropiado. Los microorganismos se pueden recubrir para facilitar la administración en el tracto gastrointestinal. Tal recubrimiento es conocido para el experto en el arte y fue, entre otros, descrito por Huyghebaert et al. (2005). La composición farmacéutica puede comprender además agentes para mejorar la viabilidad de los microorganismos, tales como, pero sin limitarse a, trehalosa. El *Lactococcus lactis*, puede ser un mutante ThyA. También se describe en este documento una composición farmacéutica en la que el microorganismo productor de VHH es un *Lactobacillus* sp., que puede ser un mutante ThyA. Los mutantes ThyA se pueden obtener por disrupción de genes, usando la construcción que codifica VHH como inserto. En este documento, se describe una composición farmacéutica por la que el microorganismo productor de VHH es *Saccharomyces cerevisiae*, tal como *S. cerevisiae* subespecie *bouardii*.

Otro aspecto de la invención es un *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α para uso en la prevención, tratamiento y/o alivio de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), en la que una cantidad eficaz del *Lactococcus*

lactis productor de VHH anti-TNF α se debe administrar al tracto gastrointestinal. Preferiblemente, dicho VHH anti-TNF α es un anticuerpo bivalente. La forma de administración puede ser cualquier forma conocida para el experto en el arte, e incluye, pero no se limita a administración oral y rectal. Preferiblemente, la forma de administración es la administración oral. La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es una enfermedad o trastorno caracterizado por un desequilibrio en la producción de TNF α , y se puede tratar mediante compuestos inactivadores de TNF α , tales como anticuerpos de TNF α . Aún más preferiblemente, dicha enfermedad es colitis crónica, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. Más preferiblemente, dicha enfermedad o trastorno es colitis crónica.

El *Lactococcus lactis* puede ser un mutante ThyA de *Lactococcus lactis* tal como un mutante ThyA de *Lactococcus lactis*, por lo que el gen que codifica el anticuerpo TNF- α se ha utilizado para interrumpir el gen THYA. En este documento se describe el uso de una cepa genéticamente modificada de *Lactobacillus* sp, tal como un mutante de *Lactobacillus* ThyA. En este documento se describe el uso de una levadura como el microorganismo productor de anticuerpos anti TNF- α . Dicha levadura puede ser *Saccharomyces cerevisiae*, tal como *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *Bouardii*.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Curso temporal de la producción de NANO3F, nanocuerpo monovalente y bivalente heterólogo por GM *L. lactis* (LL-NANO3F y LL-NANO3F-3F). LLpTREX1: control del vector; LL-mIL10: cepa *L. lactis* que secreta interleucina-10 murino. (A) análisis Western blot de proteínas secretadas a partir de las diversas cepas reveladas por anti-Myc Ab. Cada carril en la transferencia representa 250 μ L de sobrenadante de cultivo de *L. lactis* obtenido después de diferentes períodos de crecimiento (2×10^7 CFU en el tiempo cero). Como control positivo se utilizaron NANO3F (+) monovalente purificado con *E. coli* y NANO3F-3F (++) bivalente. (B) Concentraciones de proteínas marcadas con Myc heterólogas secretadas en sobrenadantes de cultivo de LL-pTREX1 (\diamond), LL-NANO3F (\blacksquare), LL-NANO3F-3F (\blacktriangle) y LL-mIL10 (O), según se determina por ELISA.

Figura 2. NANO3F, nanocuerpos monoclonal y bivalente secretados de *L. lactis* o purificados de *E. coli* son capaces de neutralizar eficazmente el TNF soluble y unido a la membrana. (A) TNF soluble (20 IU/ml) se neutralizó con NANO3F y NANO3F-3F en un ensayo de citotoxicidad de 16 horas utilizando las células WEHI 164 cl 13 en presencia de 1 μ g/ml de actinomicina D. (B) NANO3F y NANO3F-3F, nanocuerpos secretados de *L. lactis* y purificados de *E. coli* fueron capaces de inhibir los efectos citotóxicos de L929 que expresan TNF unido a la membrana inescindible. Las barras grises representan pozos donde se adicionó NANO3F o NANO3F-3F purificado (concentración total de 250 ng/ml). Las barras negras representan pozos donde se adicionaron 50 μ L de sobrenadante de lactococcus filtrado (0.22 μ m). La concentración final de LL-NANO3F y LL-NANO3F-3F fue de 250 ng/ml en cada configuración.

Figura 3. Análisis de la morbilidad en la colitis DSS crónica. (A-E) histología representativa del colon medio de ratones control sanos (A) y los ratones con colitis DSS crónica con tratamiento simulado (B) o tratados con LL-pTREX1 (C), LL-NANO3F-3F (D) o LL-mIL10 (E). (F) evaluación estadística de la puntuación histológica del colon medio. Las barras representan la media \pm SEM. La barra blanca representa el grupo control sano. Los ratones con colitis crónica inducida por DSS se sometieron a tratamiento simulado (barras tramadas) o recibieron LL-pTREX1 (barra negra), LL-NANO3F-3F (barra roja) o LL-mIL10 (barra gris). * * * y * * representan diferencias estadísticamente significativas en comparación con los grupos con tratamiento simulado y control del vector de P < 0.001 y P < 0.01, respectivamente.

Figura 4. Análisis de la morbilidad en ratones 129Sv/Ev IL-10 $^{-/-}$ de 20 semanas. Cada grupo recibió diariamente durante 14 días 2×10^9 CFU de LL-pTREX1 (control del vector), LLNANO3F-3F o LL-mIL10, excepto el grupo con tratamiento simulado. (A-D) histología representativa del colon medio a partir de ratones IL-10 $^{-/-}$ con tratamiento simulado (A) o tratados con LL-pTREX1 (B), LL-NANO3F-3F (C) o LL-mIL10 (D) (tinción con hematoxilina y eosina). Evaluación estadística de los niveles de MPO por mm 2 del tejido del colon (A) y puntuación histológica del colon distal (B). Las barras representan la media \pm SEM. Las barras tramadas representan los ratones 129Sv/Ev IL-10 $^{-/-}$ que se trataron de manera simulada, las barras negras representan los ratones 129Sv/Ev IL-10 $^{-/-}$ que recibieron el control del vector LLpTREX1, las barras rojas representan los ratones 129Sv/Ev IL-10 $^{-/-}$ que recibieron LL-NANO3F-3F y las barras grises representan los ratones 129Sv/EV IL-10 $^{-/-}$ que se trataron con LL-mIL10. * y ** representan una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control del vector de P < 0.05 y P < 0.01, respectivamente.

Figura 5. Presencia de anticuerpos específicos de nanocuerpo evaluada mediante ELISA.

Figura 6. Pretratamiento con NANO3F-3F confiere la no sensibilidad del LPS a los macrófagos Mf4/4. Las células WEHI164 cl 13 incluso se pueden matar con 5 IU de TNF

Figura 7. Evaluación estadística de la puntuación histológica del colon distal en ratones con colitis DSS crónica. Las barras representan la media \pm SEM. Las barras blancas representan el grupo de control sano. Los ratones con colitis crónica inducida por DSS recibieron diferentes cultivos de *L. lactis* durante 28 días, después de lo cual los

ratones fueron sacrificados y analizados inmediatamente. La barra negra representa el grupo tratado con LL-pTREX1 control del vector, la barra tramada los que recibieron LL-NANO3F (*L. lactis* que secreta 3F monovalente), la barra gris los que recibieron LL-NANO3F-3F (*L. lactis* que secreta 3F-3F-). * * representa una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos tratados con LLpTREX1 y LL-NANO3F control del vector de $P < 0.01$.

Figura 8. Nanocuerpos 3E monovalente y bivalente secretado de *L. lactis* (Nanocuerpo anti-TNF humano) son capaces de neutralizar eficazmente el TNF humano soluble. Se neutralizó el TNF humano soluble (con concentraciones diferentes que oscilan de 30 a 3.3 IU/ml) mediante 3E y 3E-3E en un ensayo de citotoxicidad de 16 horas usando células L929s en presencia de 1 µg/ml de actinomicina D. La supervivencia celular se calculó en relación con las células sanas La barra blanca representa los pozos donde se adicionaron 50 µl de sobrenadante de lactococcus filtrado (0,22 µm) del control del vector LLpTREX1. Las barras negras y grises representan pozos en los que se adicionaron 50 µl de sobrenadante lactocócico filtrado (0,22 µm); que contienen 3E o 3E-3E secretadas de *L. lactis*, respectivamente. La concentración final de 3E o 3E-3E secretada de *L. lactis* fue de 250 ng/ml en cada configuración.

15 Ejemplos

Material y métodos para los ejemplos

Bacterias y plásmidos

La cepa de *L. lactis* MG1363 se usó a lo largo de este estudio. Las bacterias se cultivaron en medio GM17, esto es M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 0.5% de glucosa. Las suspensiones en de reserva de todas las cepas se almacenaron a -20°C en glicerol al 50% en GM17. Para inoculaciones intragástricas, las suspensiones de reserva se diluyeron 200 veces en GM17 fresco y se incubaron a 30°C. Alcanzaron una densidad de saturación de 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml en 16 horas. Las bacterias se cosecharon por centrifugación y se concentraron 10 veces en medio BM9 (Schotte, Steidler et al. 2000). Para el tratamiento, cada ratón recibió 100 µl de esta suspensión diariamente por catéter intragástrico.

25 Identificación y formato de un nanocuerpo de TNF anti-murino

La generación de nanocuerpo de TNF anti-murino se llevó a cabo esencialmente como se describe en el documento WO2004041862. Después de inmunizar llamas con mTNF, clonación subsiguiente del repertorio VHH y paneo, se aisló NANO3F del nanocuerpo (MW-15 kDa). El nanocuerpo específico de TNF murino se convirtió en un formato bivalente (NANO3F-3F codificado, MW-30 kDa) utilizando los 12 residuos aminoterminales de la secuencia de bisagra superior de llama IgG2a como espaciador. El ADNc de NANO3F y NANO3F-3F, extendido en sus extremos 3' con la secuencia que codifica HisG y Myc-tag, se fusionaron a la señal de secreción Usp45 (van Asseldonk, Rutten et al., 1990) en dirección 3' del promotor lactococcal P1 (Waterfield, Le Page et al., 1995) y expresado en MG1363 (se pueden obtener detalles de la construcción del plásmido de los autores). Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portaban la secuencia codificante de NANO3F o NANO3F-3F se denominaron LL-NANO3F y LL-NANO3F-3F, respectivamente. LL-pTREX1, que es MG1363 que contiene el vector vacío pTREX1, sirvió como control.

Cuantificación de nanocuerpos en medio *L. lactis*.

Se cuantificaron LL-NANO3F marcado con Myc y LL-NANO3F-3F por adsorción directa de sobrenadantes de *L. lactis* en bruto a placas ELISA (Maxisorp F96, Nunc, Rochester, NY) y posterior detección con un mAb de ratón específico contra el epítipo Myc (Sigma, St. Louis, MO).

Para la cuantificación de nanocuerpos 3F-3F secretados in vivo en tejido de colon, el colon completo se homogeneizó en PBS que contenía BSA al 1% y se sometió a ultrasonido. Los nanocuerpos 3F-3F se midieron en el sobrenadante de colon con el protocolo de cuantificación de nanocuerpos.

Medición de los niveles de anticuerpos anti-nanocuerpos en suero de ratón.

Los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 100 µg de nanocuerpos, o intragástricamente con LL-NANO3F-3F, diariamente durante un período de 14 días y posteriormente se sangraron. se recubrieron los nanocuerpos a una concentración de 10 µg/ml en placas de microtitulación (NUNC Maxisorb) durante la noche a 4°C. La placa se lavó 5 veces con PBS-Tween y se bloqueó durante 2 horas a RT con PBS-caseína al 1%. Las muestras se aplicaron a una dilución de 1/50 en PBS durante 2 horas a RT. La placa se lavó 5 veces y la detección se realizó mediante incubación con inmunoglobulina HRP antiratón policlonal de conejo (DAKO, diluida 3,000 veces) durante una hora a RT y después de lavar las placas se tiñeron con ABTS/H2O2. Se midió el OD405nm.

Bioensayo TNF anti-soluble y unido a membrana

5 El efecto inhibitor de los nanocuerpos NANO3F y NANO3F-3F en mTNF soluble (20 IU/ml) se midió en un ensayo de citotoxicidad de 16 horas usando las células WEHI 164 cl 13 de fibroblasto de ratón en presencia de 1 µg/ml de actinomicina D como se describe (Espevik and Nissen-Meyer 1986). El efecto de NANO3F y NANO3F-3F para contrarrestar el efecto citotóxico de TNF unido a la membrana se determinó en las células WEHI 164 cl 13 después de adicionar células L929, expresando TNF unido a la membrana, inescindible en el cultivo de células (Decoster et al., 1998).

Estimulación de macrófagos con LPS

10 Para medir el efecto de NANO3F-3F sobre la inducción de citoquinas proinflamatorias por LPS, se incubaron macrófagos MF4/4 (Desmedt et al. 1998) con NANO3F-3F (100 µg/ml). Después de 1 hora las células se lavaron extensamente (3X) en un volumen suficiente de PBS para eliminar completamente todos los nanocuerpos presentes en solución. Las células se resuspendieron y se incubaron en presencia o ausencia de LPS durante 4 horas. Las células se lavaron (1X) en PBS y después de 4 horas de incubación, los sobrenadantes y las células se separaron por centrifugación. Para medir la liberación de TNF soluble, se usó el bioensayo de células WEHI 164 cl 13.

Animales

20 Se obtuvieron ratones BALB/c hembra de 11 semanas, procedentes de Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania). Se alojaron en condiciones de SPF. Se alojaron ratones con deficiencia genética IL-10 (129Sv/Ev IL-10^{-/-}) (Kuhn, Lohler et al., 1993) y se criaron en condiciones de SPF. Los ratones IL-10^{-/-} se usaron a las 20 semanas, momento en el que la colitis crónica se había desarrollado completamente. Todos los ratones fueron alimentados con alimentación de laboratorio estándar y agua del grifo *ad libitum*. Los estudios en animales fueron aprobados por the Ethics Committee of the Department for Molecular Biomedical Research, Universidad de Gante (Expediente No. 04/02).

Inducción de colitis crónica por el DSS

25 Se indujeron a colitis crónica ratones que pesaban aproximadamente 21 g, mediante cuatro ciclos de administración de DSS al 5% (p/v) (40 kDa, Applichem, Darmstadt, Alemania) en el agua potable, alternando con períodos de recuperación de 10 días con agua potable normal. (Okayasu, Hatakeyama et al. 1990; Kojouharoff, Hans et al. 1997) El tratamiento se inició arbitrariamente al día 21 después del cuarto ciclo de DSS.

Ensayo de mieloperoxidasa (MPO)

30 La actividad de MPO en el tejido de colon central se midió como se describe (Bradley, Priebat et al., 1982). Se usó MPO humana pura como un estándar (Calbiochem, San Diego, CA). Los datos se expresan en µg de tejido de colon MPO/mm².

Análisis histológico

35 Para el análisis histológico, el colon se retiró, se limpió y se abrió longitudinalmente. Se tomó un segmento de 1 cm de la parte media del colon, se incrustó en parafina y se seccionó longitudinalmente. Se cortaron tres secciones de 4 µm a intervalos de 200 µm y se tiñeron con hematoxilina/eosina. Las secciones de colon fueron numeradas al azar e interpretadas semicuantitativamente de manera ciega por un patólogo. La puntuación histológica es la suma del daño epitelial y de la infiltración linfocítica, cada uno de los cuales va de 0 a 4 como se describe (Kojouharoff, Hans et al., 1997).

40 Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media ± SEM. Los datos paramétricos se analizaron con un análisis de varianza de una vía seguido por un ensayo de Dunnett de comparaciones múltiples después del ensayo. Los datos no paramétricos (puntuación) se analizaron con una prueba de Mann-Whitney.

Ejemplo 1: Producción de VHH anti-TNF-α por *L. lactis* in vitro

45 *L. lactis* se transformó con los plásmidos que codifican NANO3F y NANO3F-3F. La producción de los anticuerpos se comprobó mediante Western blot y ELISA, utilizando como referencia una cepa transformada con el plásmido vacío pTRES y una cepa productora de IL10 como referencia. Los resultados se muestran en la figura 1. NANO3F-3F es producido por *L. lactis* en cantidades similares o mayores que NANO3F. La cantidad producida es significativamente mayor que para IL10.

50 **Ejemplo 2:** LL-NANO3F-3F es bioactivo e inhibe tanto el TNF-α soluble como el unido a la membrana

El efecto inhibitor de los nanocuerpos NANO3F y NANO3F-3F, producidos por *L. lactis* sobre mTNF soluble, se midió en un ensayo de citotoxicidad usando las células WEHI 164 cl 13 de fibroblasto de ratón, como se describe por Espevik and Nissen-Meyer (1986). NANO3F y NANO3F-3F producidos por *E. coli* se utilizaron como referencia positiva. Tanto los nanocuerpos purificados como los nanocuerpos producidos por *L. lactis* pueden neutralizar el TNF soluble. (Figura 2A) El efecto de NANO3F y NANO3F-3F para contrarrestar el efecto citotóxico de TNF unido a membrana se determinó en las células WEHI 164 cl 13 después de adicionar células L929, expresando TNF inescindible, unido a la membrana en el cultivo celular (Decoster et al. 1998). El efecto de NANO3F es menos pronunciado, tanto con la forma purificada como con la forma producida por *L. lactis*, pero el efecto de los nanocuerpos NANO3F-3F es claro en ambos casos (Figura 2B)

5

10 **Ejemplo 3:** Efecto de LL-NANO3F-3F in vivo sobre colitis crónica inducida por DSS establecida

La colitis crónica fue inducida por DSS como se describe en materiales y métodos. Los ratones se trataron diariamente con 2×10^9 unidades formadoras de colonias (cfu) de LL-pTREX1, LL-NANO3F-3F o LL-mIL10. Se usó un tratamiento simulado y ratones sanos ("control de agua") como control adicional. El efecto de los nanocuerpos nano3F-3F liberado por *L. lactis* es comparable con la protección obtenida por la IL-10 producida in situ (Figura 3).

15 **Ejemplo 4:** Efecto de LL-NANO3F-3F in vivo sobre la enterocolitis IL-10^{-/-} establecida

Para evaluar la protección en la enterocolitis IL-10^{-/-}, morbilidad en ratones de 20 semanas tratados con 129Sv/Ev IL-10^{-/-} tratados y no tratados. Cada grupo recibió diariamente durante 14 días 2×10^9 CFU de LL-pTREX1 (control del vector), LL-NANO3F-3F o LL-mIL10, excepto el grupo con tratamiento simulado. Los resultados se resumen en la figura 4. Tanto el ensayo de mieleroxidasas como el puntaje histológico indican una protección significativa en los ratones tratados con LL-NANO3F-3F.

20

Ejemplo 5: Inmunogenicidad de NANO3F-3F

Para evaluar un posible efecto inmunogénico adverso de LL-NANO3F-3F, los ratones se trataron intragástricamente durante un periodo de 14 días con LL-NANO3F-3F, usando inyección intraperitoneal de nanocuerpos purificados como control. Los niveles de anticuerpos anti-nanocuerpo se midieron en el suero de ratón. Los resultados se muestran en la figura 5. Aunque la inyección interperitoneal de NANO3F-3F está dando una respuesta inmune clara, el tratamiento con LL-NANO3F-3F no es inmunógeno y las pruebas son seguras a este respecto.

25

Ejemplo 6: Efecto de NANO3F-3F sobre la inducción de LPS de citocinas proinflamatorias

Para medir el efecto de NANO3F-3F sobre la inducción de citoquinas proinflamatorias por LPS, se incubaron macrófagos MF4/4 (Desmedt et al., 1998) con NANO3F-3F. Las células se lavaron y después se incubaron con LPS. La liberación de TNF soluble se midió usando el ensayo de toxicidad de células WEHI 164 cl 13. Los resultados se muestran en la figura 6. El pretratamiento de los macrófagos con nanocuerpos NANO3F-3F da una clara protección contra la producción de TNF soluble inducida por LPS.

30

Ejemplo 7: Los anticuerpos bivalentes se desempeñan sorprendentemente mejor que los anticuerpos monovalentes

35

Aunque los anticuerpos bivalentes son más grandes que los monovalentes, no afecta a la producción en *Lactococcus*. La producción de anticuerpos bivalentes es al menos tan buena si no mejor que la de anticuerpos monovalentes (Figura 1). Sin embargo, aún más importante es la eficacia de los anticuerpos bivalentes. A partir de los experimentos in vivo, es obvio que un anticuerpo monovalente anti-TNF sólo da como resultado una mejora marginal no significativa de la puntuación histológica, mientras que la administración de un anticuerpo bivalente secretor de *L. lactis* da como resultado una mejora significativa (Figura 7). De hecho, el efecto neutralizante de los anticuerpos bivalentes es, para una concentración comparable de proteína, más pronunciada que la de los anticuerpos monovalentes. Mientras no se alcance una neutralización completa, la mejora es más que un factor 2, lo que indica que el efecto no se debe únicamente a la doble valencia de los nanocuerpos (Figura 8)

40

45 Referencias

Bradley, P. P., D. A. Priebat, et al. (1982). "Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker." *J Invest Dermatol* 78(3): 206-9.

Espevik, T. and J. Nissen-Meyer (1986). "A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes." *J Immunol Methods* 95(1): 99-105.

50 Huyghebaert, N., A. Vermeire, S. Neiryneck, L. Steidler, E. Remaut, and J.P. Remon. (2005) "Development of an enteric-coated formulation containing freeze-dried, viable recombinant *Lactococcus lactis* for the ileal mucosal delivery of human interleukin-10." *Eur J Pharm Biopharm* 60(3): 349-59

- Kojouharoff, G., W. Hans, et al. (1997). "Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice." *Clin Exp Immunol* 107(2): 353-8.
- Kuhn, R., J. Lohler, et al. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis". *Cell* 75(2): 263-74.
- 5 Okayasu, I., S. Hatakeyama, et al. (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice". *Gastroenterology* 98(3): 694-702.
- Schotte, L., L. Steidler, et al. (2000). "Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*". *Enzyme Microb Technol* 27(10): 761-765.
- van Asseldonk, M., G. Rutten, et al. (1990). "Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363." *Gene* 95(1): 155-60.
- 10 Waterfield, N. R., R. W. Le Page, et al. (1995). "The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis*." *Gene* 165(1): 9-15.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α para la preparación de un medicamento para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), en la que se debe administrar una cantidad eficaz de dicho *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α al tracto gastrointestinal.
- 5 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho VHH anti-TNF α es un anticuerpo bivalente.
3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha IBD es colitis crónica.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha IBD es enfermedad de Crohn.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha IBD es colitis ulcerosa.
- 10 6. Una composición farmacéutica para administración oral que comprende al menos un *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α .
7. Una composición farmacéutica para administración oral de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho VHH anti-TNF α es un anticuerpo bivalente.
- 15 8. Un *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α para uso en la prevención, tratamiento y/o alivio de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), en el que una cantidad eficaz del *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α se debe administrar al tracto gastrointestinal.
9. El *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho VHH anti-TNF α es un anticuerpo bivalente.
10. El *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α para uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que dicho *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α se debe administrar por vía oral.
- 20 11. El *Lactococcus lactis* productor de VHH anti-TNF α para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicha enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona del grupo que consiste en colitis crónica, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

FIG 1

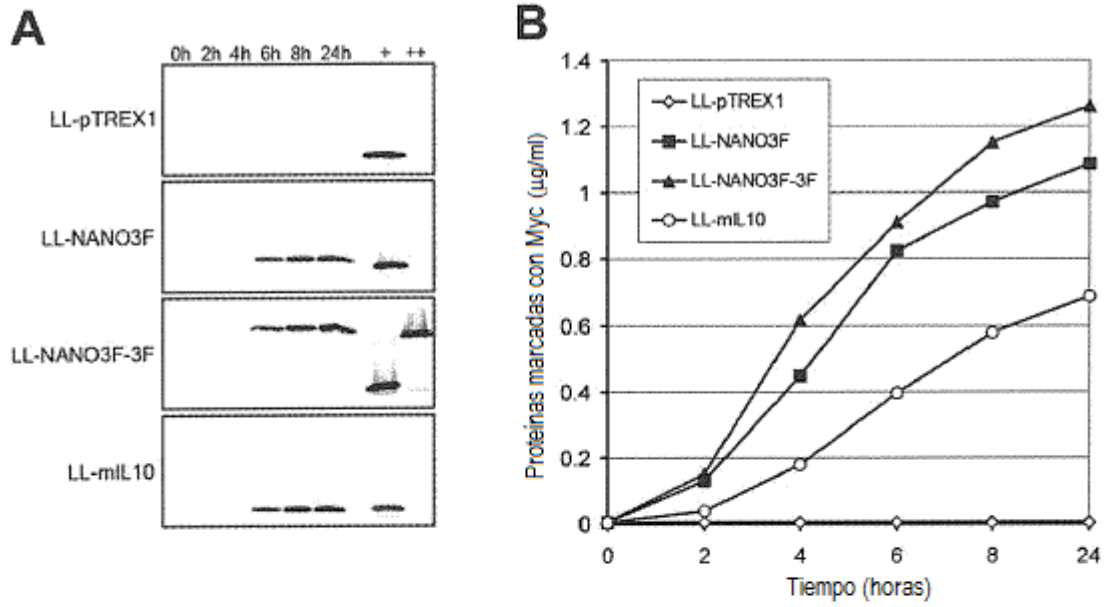


FIG 2A

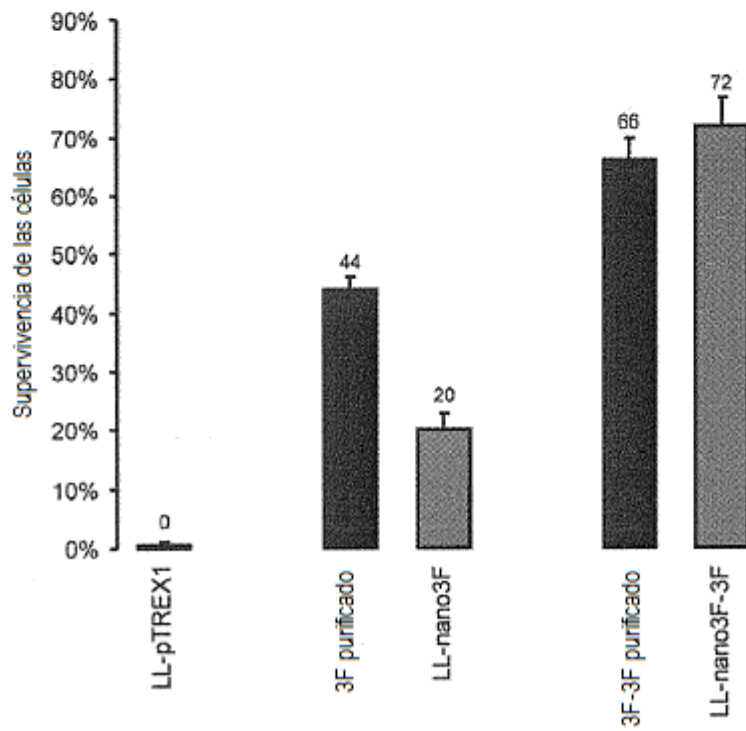


FIG 2B

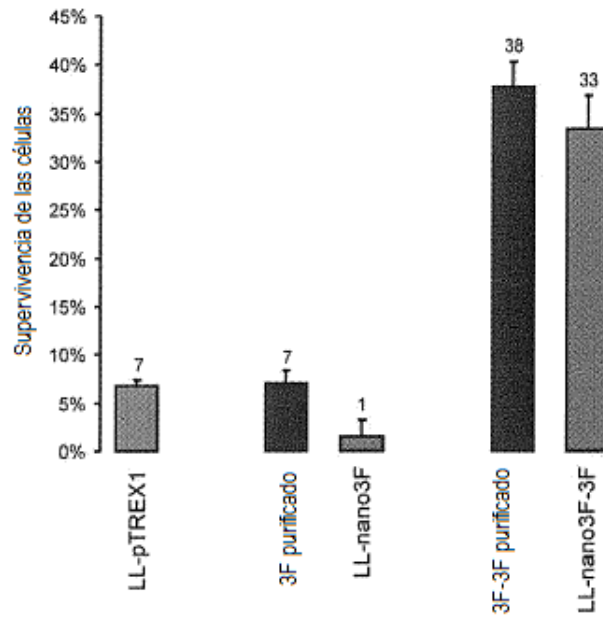


FIG 3

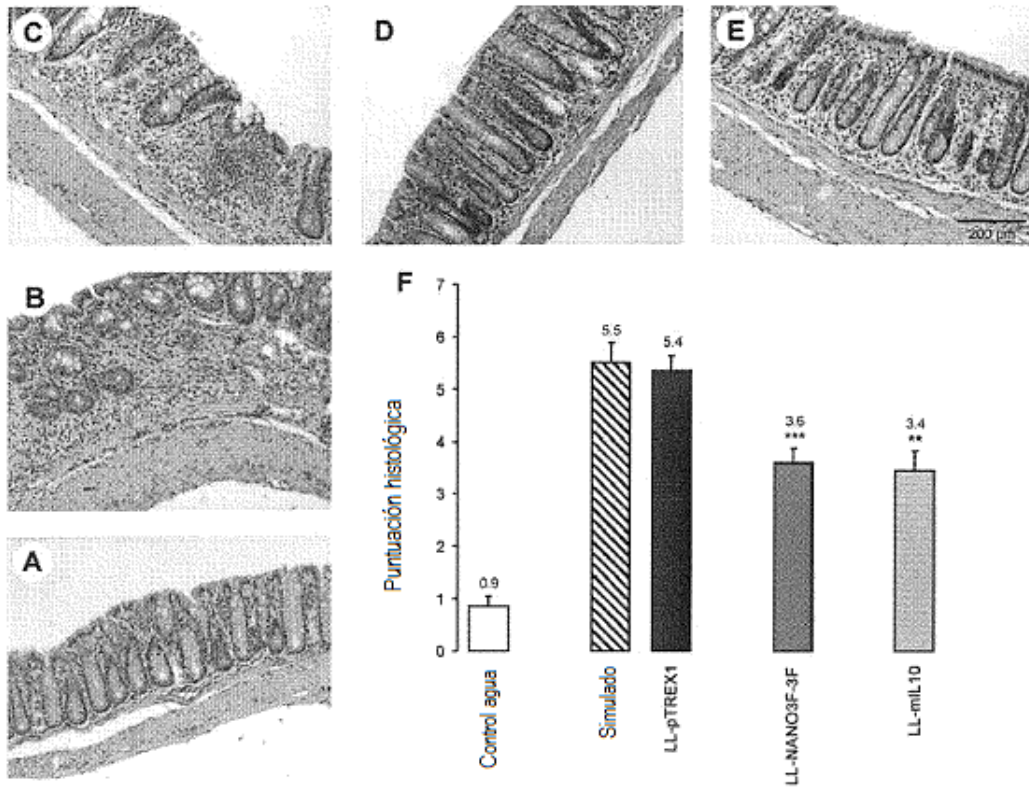


FIG 4

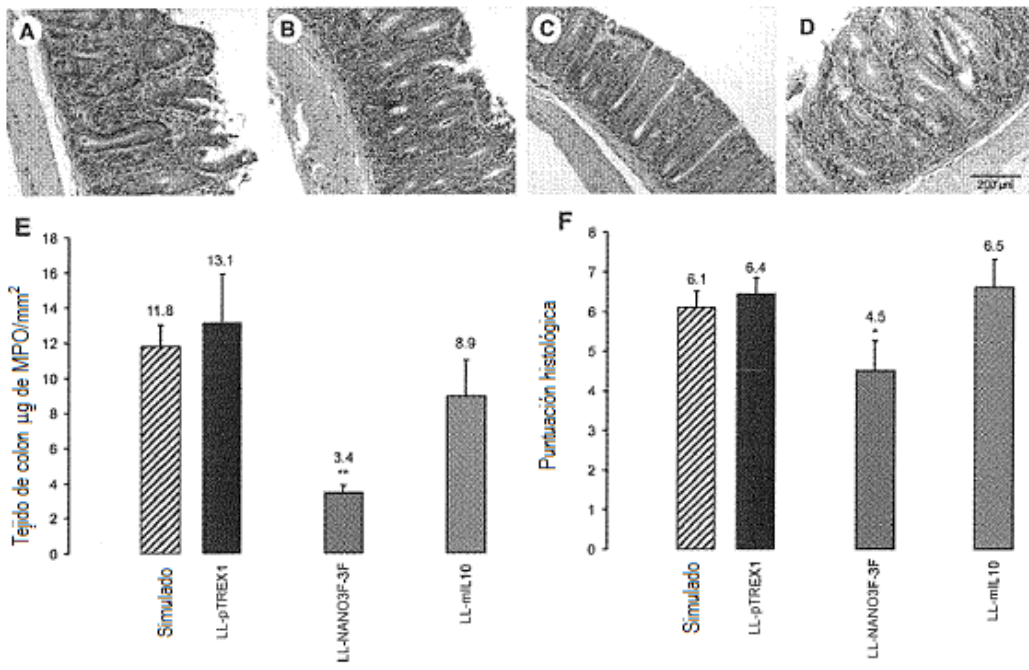


FIG 5

Inmunogenicidad de NANO3F-3F

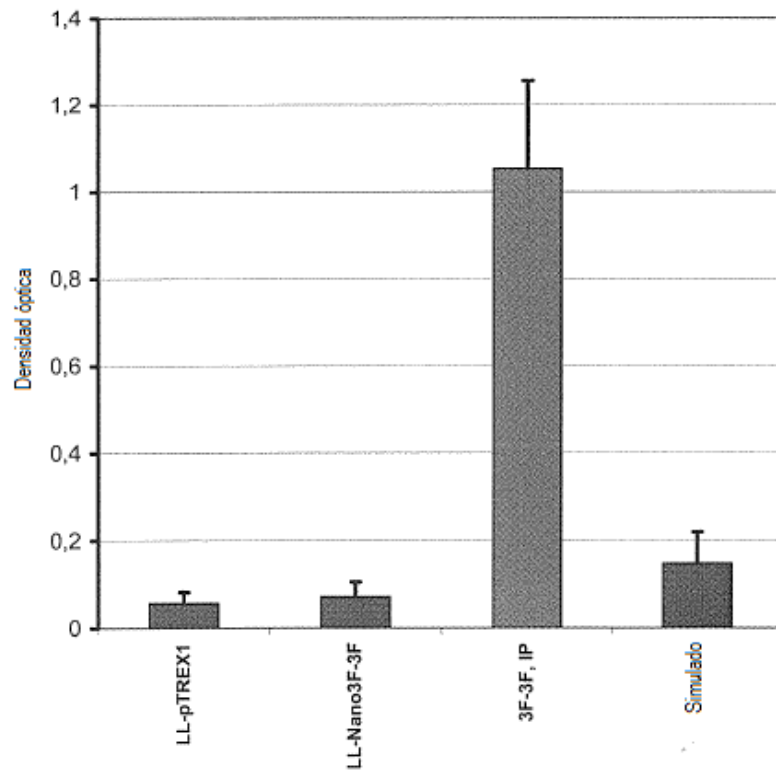


FIG 6

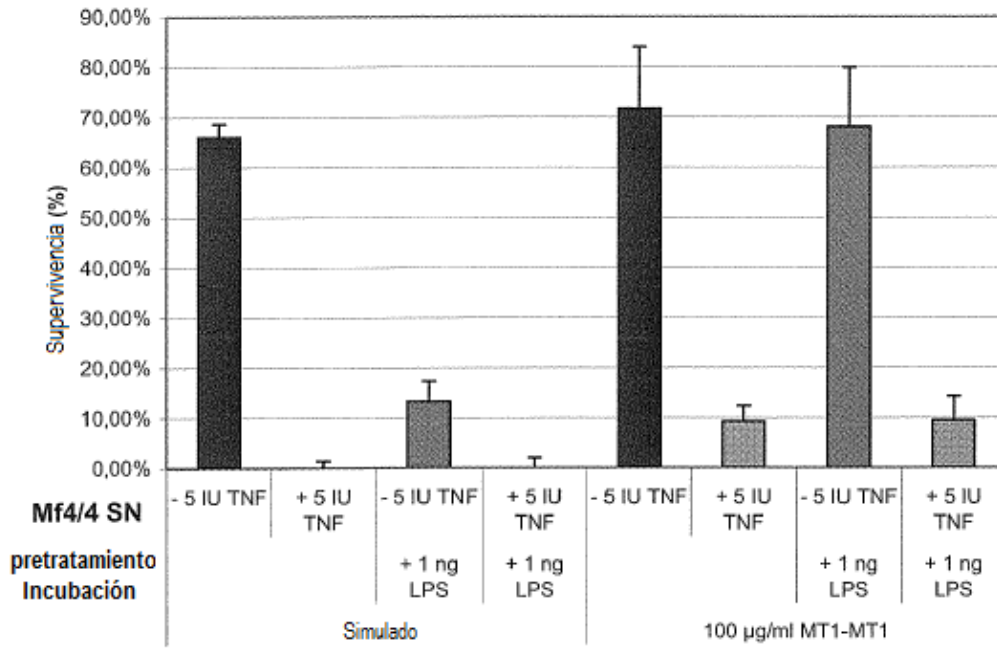


FIG 7

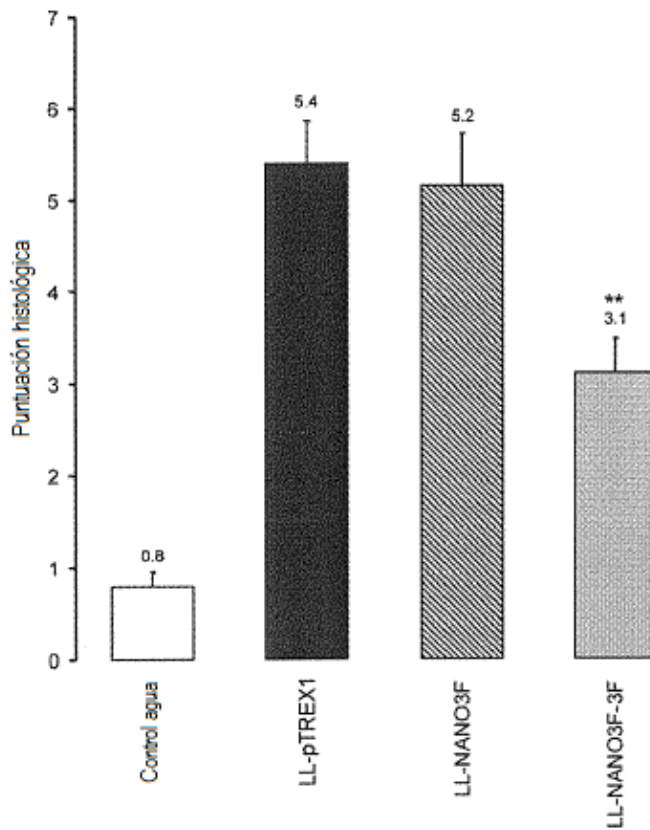


FIG 8

