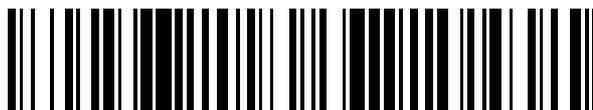


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 658**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/35** (2006.01)

**A61K 39/36** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2008 E 14169790 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2774621**

54 Título: **Tratamiento de enfermedad inmune mediante suministro a la mucosa de antígenos**

30 Prioridad:

**25.01.2007 EP 07447006**

**19.07.2007 EP 07112792**

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

**07.05.2018**

73 Titular/es:

**INTREXON ACTOBIOTICS NV (100.0%)  
Industriepark Zwijnaarde 7 C building D  
9052 Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**ROTTIERS, PIETER y  
SNOECK, VEERLE**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

ES 2 666 658 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedad inmune mediante suministro a la mucosa de antígenos

La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunes, alérgicas, y enfermedad de injerto contra anfitrión mediante suministro a la mucosa de un antígeno mediante *Lactococcus* preferiblemente *Lactococcus lactis*.

## 5 Campo de la invención

El sistema inmunitario tiene la tarea de distinguir entre el auto y el no auto. El sistema inmunitario de la mucosa, presente a lo largo de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, tiene la carga adicional de coexistir con una abundancia de bacterias y antígenos inoos, tales como antígenos de alimentos, antígenos transportados por el aire o la flora bacteriana comensal. Una característica clave del sistema inmunitario de la mucosa es su capacidad de permanecer tolerante a estos antígenos, mientras que retiene la capacidad de repeler efectivamente los patógenos. La introducción del antígeno sistémicamente, ya sea por inyección o por lesión, conduce a la infiltración local de células inflamatorias y a la producción específica de inmunoglobulinas. Por el contrario, los antígenos introducidos en las superficies de la mucosa, tales como los tractos gastrointestinal y genitourinario, provocan la inhibición activa de la respuesta inmune a esos antígenos sistémicamente. La inducción específica de estas respuestas reguladas mediante la administración de antígeno a través del tracto gastrointestinal se conoce como tolerancia oral. La administración oral de antígeno puede llevar a la falta de respuesta sistémica y es una alternativa atractiva a las invenciones médicas inmunosupresoras que tienen efectos secundarios indeseables (como los esteroides). La invención se basa, en particular, en el campo de la tolerancia a dosis baja, obtenida mediante exposición continua a bajas dosis de antígeno. Se han propuesto inducciones de tolerancia a través de la mucosa como una estrategia de tratamiento contra enfermedades autoinmunes, alérgicas e inflamatorias.

20

Estado de la técnica

La siguiente discusión de los antecedentes de la invención se proporciona solo para ayudar al lector a comprender la invención y no se admite que describa o constituya la técnica anterior de la presente invención.

25

30

35

Las enfermedades autoinmunes, alérgicas e inflamatorias representan una enorme carga para el paciente y la sociedad, lo que resulta en una disminución de la calidad de vida y enormes costes. Más aún, no existe un tratamiento adecuado sin efectos secundarios aceptables o que sea socialmente apropiado. Los tratamientos actuales para la enfermedad autoinmune son principalmente paliativos, generalmente inmunosupresores o antiinflamatorios. Las terapias no inmunes, tales como el reemplazo hormonal en la tiroiditis de Hashimoto o la DM tipo 1, tratan los resultados de la respuesta autoagresiva. El tratamiento con esteroides o NSAID limita los síntomas inflamatorios de muchas enfermedades. Se utiliza IVIG para CIDP y GBS. Se ha demostrado que terapias inmunomoduladoras más específicas, tales como los antagonistas de  $\alpha$ -TNF etanercept, son útiles en el tratamiento de la RA. No obstante, estas inmunoterapias se pueden asociar con un mayor riesgo de efectos adversos, tales como una mayor susceptibilidad a infección. La enfermedad celíaca, que se puede caracterizar por una inflamación crónica del intestino delgado, solo se puede tratar efectivamente mediante una dieta socialmente restrictiva que requiere la abstinencia de por vida de los alimentos que contienen trigo, centeno o cebada.

Si bien una dieta estricta sin gluten puede conducir a la curación del intestino, la intolerancia al gluten es permanente.

40

45

La enfermedad celíaca, también conocida como celiaquía o enteropatía sensible al gluten, es una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla a partir de una respuesta inmune a granos dietéticos específicos que contienen gluten. El diagnóstico se puede realizar en base a la presentación clásica de diarrea, deposiciones grasas, hinchazón abdominal y calambres, pérdida de peso, enfermedades óseas metabólicas, anemia y así como también la presencia de anticuerpos séricos con especificidad por gliadina y transglutaminasa tisular (tTG) (también denominada anti-endomisial). La lesión de la mucosa se localiza en la parte proximal del intestino delgado y se caracteriza por atrofia vellosa, hiperplasia de las células de la cripta e infiltración linfocítica del epitelio y lámina propia, que liberan citoquinas proinflamatorias, tales como IL-2 e IFN- $\gamma$ , en respuesta a gliadina. La enfermedad celíaca se puede considerar la enteropatía sensible a alimentos más común en los humanos, y puede aparecer en cualquier momento de la vida de una persona. La prevalencia está en el rango de 1:100 a 1:300 en poblaciones occidentales, árabes e indias. Además del gluten, la enfermedad se puede desencadenar por primera vez después de cirugía, infección viral, estrés emocional severo, embarazo o parto.

50

55

Por lo tanto, la inducción de tolerancia oral específica antigénica sería un enfoque terapéutico atractivo. Aunque la tolerancia oral se describió por primera vez en 1911, no fue sino hasta finales de la década de 1970 cuando los investigadores comenzaron a abordar los mecanismos implicados (Mayer and Shao, 2004a). Se han propuesto diversos mecanismos para el desarrollo de tolerancia oral, que van desde la supresión de células T anti-específicas, hasta desviación inmune e inducción de anergia hasta la supresión por Tregs (Mucida et al., 2005). La mayoría de los investigadores coinciden en que existen dos formas distintas de obtener tolerancia oral, la tolerancia a altas dosis, obtenida después de una sola dosis alta de antígeno, que se basa en anergia y/o supresión (Friedman and Weiner, 1994), y la baja tolerancia a la dosis, obtenida por exposición repetida a bajas dosis de antígeno, mediada por la supresión activa de las respuestas inmunes por las células T CD4<sup>+</sup>, que incluyen células T reguladoras que producen Foxp3<sup>+</sup>, IL-10 y/o TGF- $\beta$ . Es importante destacar que, se muestra que las células T reguladoras inducidas a través de

tolerancia de la mucosa median la supresión de activación inespecífica, un proceso a través del cual las células reguladoras específicas para una proteína suprimen la respuesta de las células efectoras cercanas a otra proteína. La supresión de activación inespecífica es una característica importante adicional de la supresión inducida por antígeno porque el grupo de antígenos que inducen autoinmunidad específica a órgano es en gran parte desconocido, y anula el fenómeno de propagación de epítipo. La propagación de epítopos es una complicación de enfermedades autoinmunes y alérgicas por lo que la respuesta inmune iniciadora se expande con el tiempo para incluir respuestas a otros antígenos.

El suministro dirigido y más eficiente de moléculas para aplicaciones terapéuticas y profilácticas es una prioridad para la industria farmacéutica. Las estrategias efectivas deberían reducir la dosis requerida, aumentar la seguridad y mejorar la eficacia al enfocar las moléculas en el sitio de acción deseado. Las rutas mucosas del suministro de fármacos y vacunas ofrecen una serie de ventajas logísticas y biológicas en comparación con la inyección. El suministro oral es particularmente atractivo como resultado de la facilidad de administración. Sin embargo, la degradación gastrointestinal y los bajos niveles de absorción generalmente hacen que esta ruta de administración de péptidos y proteínas sea inefectiva. También se están investigando rutas alternativas de mucosa, como las rutas nasal, rectal, pulmonar y ocular.

Por lo tanto, sigue subsistiendo un problema en la técnica para inducir efectivamente la tolerancia de antígenos.

#### Resumen de la invención

Sorprendentemente, se encontró que un antígeno inmunodominante que se suministra, y preferiblemente está continuamente presente, en un sitio de la mucosa de un paciente induce una inmunotolerancia específica de antígeno. En particular, cuando un microorganismo tal como preferiblemente *Lactococcus lactis* (LL), que expresa constitutivamente y secreta un antígeno inmunodominante, se suministra diariamente en un sitio de mucosa, se indujo una tolerancia inmune específica de antígeno. Observamos que el suministro a la mucosa de dicho antígeno por un microorganismo de *L. lactis* da una supresión significativamente mejor de la respuesta inmune específica de antígeno en comparación con el único suministro de la mucosa de dicho antígeno o dicho microorganismo.

Se demuestra que la invención puede inducir tolerancia oral con una eficiencia mucho más alta que con la monoterapia con solo antígeno o con *L. lactis* de control. La activación *in vivo* de las células T reguladoras específicas de antígeno se potenciaba fuertemente. Específicamente, el suministro por mucosa de un péptido derivado de gliadina, que es inmunodominante para las respuestas de células T mediadas por DQ8 mediante *L. lactis* genéticamente modificado, induce la supresión de respuestas de células T restringidas DQ8 locales y sistémicas. El tratamiento dio como resultado una disminución específica a antígeno de la capacidad proliferativa de los esplenocitos y células del nódulo linfático inguinal, que era críticamente dependiente de la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  y se asoció con una inducción significativa de células T reguladores de Foxp3<sup>+</sup>. Debido a que este enfoque de bacterias que suministran antígenos tiene la capacidad de potenciar la tolerancia oral incluso en el contexto de una hipersensibilidad establecida, es aplicable para el tratamiento de enfermedad celíaca y otras enfermedades autoinmunes y/o alérgicas. La eficacia de la invención se demostró en modelos de ratón con enfermedades autoinmunes y alérgicas, así como en el contexto de la inmunoactivación de agentes terapéuticos.

La presente invención se refiere a un microorganismo que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno para uso en el tratamiento de una respuesta inmune relacionada con una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica y enfermedad de injerto contra anfitrión, en un sujeto humano, en el que dicho antígeno se expresa y secreta constitutivamente por dicho microorganismo, en el que dicho microorganismo es una bacteria *Lactococcus sp.*, y dicho antígeno es para ser administrado a través de suministro a la mucosa, y en el que dicho sujeto humano ha establecido hipersensibilidad a dicho antígeno.

Se contemplan las siguientes realizaciones de dicho microorganismo para uso como se estableció anteriormente para la presente invención.

(i). El microorganismo para uso como se estableció anteriormente, en el que el microorganismo secreta un antígeno implicado en la inducción de una alergia.

(ii). El microorganismo para el uso como se estableció anteriormente, en el que la alergia es un asma alérgica, o alergia a alimentos.

(iii). El microorganismo para el uso como se estableció anteriormente, en el que dicho microorganismo:

- es *Lactococcus lactis* (LL);

- se administra diariamente;

- de suministra durante por lo menos 1 semana, más preferiblemente durante por lo menos 1 mes o 1 año;

- se suministra por lo menos una vez al día, preferiblemente dos veces al día;

- se suministra en una dosis de por lo menos 10 femtogramos a 100 mg por día, tal como 100 fg a 10 mg por día, o 1 pg a 1 mg por día, o 10 pg a 100  $\mu$ g por día, o 1 ng a 1  $\mu$ g por día, o 10 ng a 100 mg por día; y/o

- se suministra mediante pulverización, cápsula, aerosol, pastillas oblongas, bolo, comprimido, bolsitas, líquido, suspensión, emulsión o pastillas.
  - (iv). El microorganismo para el uso como se estableció anteriormente, en el que dicho suministro a la mucosa se selecciona del grupo que consiste de suministro rectal, suministro bucal, suministro pulmonar, suministro ocular, suministro nasal, suministro vaginal y suministro oral.  
5
  - (v). El microorganismo para el uso como se estableció anteriormente, en el que:
    - dicho antígeno induce células T reguladoras (Treg), preferiblemente induce células Treg Foxp3+;
    - dicho antígeno reduce la proliferación de células del nódulo linfático de bazo e inguinal;
    - dicho antígeno suprime la respuesta de célula T específica a antígeno inflamatoria; y/o
    - 10 - dicho antígeno es un péptido Der p 1 o  $\beta$ -lactoglobulina (BLG).
  - (vi) El microorganismo para el uso como se estableció anteriormente, en el que dicha secreción es constitutiva.
  - (vii). El microorganismo para el uso como se estableció anteriormente, en el que dicho microorganismo se formula como un medicamento, alimento médico o nutracéutico.
  - (viii). La composición farmacéutica para uso como se estableció anteriormente en la que el antígeno está involucrado en la inducción de una alergia.  
15
  - (ix). La composición farmacéutica para el uso como se estableció anteriormente, en la que la alergia es un asma alérgica, o alergia a alimentos.
  - (x). La composición farmacéutica para el uso como se estableció anteriormente, en la que:
    - dicho microorganismo es *Lactococcus lactis* (LL);
    - 20 - dicho microorganismo está presente en una dosis de por lo menos 10 femtogramos a 100 mg, tal como 100 fg a 10 mg, o 1 pg a 1 mg, o 10 pg a 100  $\mu$ g, o 100 pg a 10  $\mu$ g, o 1 ng a 1  $\mu$ g, o 10 ng a 100 mg; y/o
    - dicha composición farmacéutica se formula en pulverizaciones, cápsulas, aerosoles, pastillas oblongas, bolo, comprimidos, bolsitas, líquidos, suspensiones, emulsiones o pastillas.
  - (xi). La composición farmacéutica para el uso como se estableció anteriormente, en la que:
    - 25 - dicho antígeno induce células T reguladoras (Treg), preferiblemente induce células Treg Foxp3+;
    - dicho antígeno reduce la proliferación de células del nódulo linfático de bazo e inguinal;
    - dicho antígeno suprime la respuesta de célula T específica a antígeno inflamatoria; y/o
    - dicho antígeno es un péptido Der p 1 o  $\beta$ -lactoglobulina (BLG).
  - (xii). La composición farmacéutica para el uso como se estableció anteriormente en la que la respuesta inmune relacionada con la enfermedad es una enfermedad alérgica.  
30
  - (xiii). El medicamento, nutracéutico o alimento médico para el uso como se estableció anteriormente, en el que el antígeno está involucrado en la inducción de una alergia.
  - (xiv). El medicamento, nutracéutico o alimento médico para uso como se estableció anteriormente, en el que la alergia es un asma alérgica, o alergia a alimentos.
  - 35 También se abarca en este documento una composición farmacéutica que comprende un microorganismo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de una respuesta inmune relacionada con una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica y enfermedad de injerto contra anfitrión, en un sujeto humano, en la que dicho microorganismo secreta constitutivamente un antígeno, que está involucrado en la inducción de una respuesta inmune relacionada con la enfermedad, en la que el microorganismo es  
40 una bacteria *Lactococcus sp.*, y en la que dicho sujeto humano ha establecido hipersensibilidad a dicho antígeno.
- Las siguientes realizaciones de dicha composición farmacéutica para el uso como se estableció anteriormente se contemplan para la presente invención.
- (xv). El medicamento, nutracéutico o alimento médico para uso como se estableció anteriormente, en el que dicho microorganismo es *Lactococcus lactis* (LL).
  - 45 Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta divulgación, se hace referencia a diversas publicaciones, patentes y especificaciones de patentes publicadas mediante una cita de identificación.

#### Técnicas generales

5 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química orgánica, farmacología, biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Second Edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); the series "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); 10 "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodicals) "Polymerase Chain Reaction" (Mullis et al., eds., 1994); and "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan et al., eds., 1991).

#### Definiciones

15 Como se utiliza en este documento, ciertos términos pueden tener los siguientes significados definidos. Como se utiliza en la especificación y reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de las mismas. De forma similar, el uso de "un compuesto" para el tratamiento o preparación de medicamentos como se describe en este documento contempla utilizar uno o más compuestos de esta invención para dicho tratamiento o preparación a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

20 Como se utiliza en el presente documento, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros. "Consistir esencialmente en" cuando se utiliza para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de significancia esencial para la combinación. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en este documento no 25 excluirá contaminantes en traza del método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "que consiste en" significará excluir más que oligoelementos de otros ingredientes y etapas de método sustanciales para administrar las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

#### Invención.

30 Se demuestra que el suministro en la mucosa de un antígeno dominante inmunitario secretado por un microorganismo, tal como preferiblemente *L. lactis*, induce la supresión de las respuestas de células T locales y sistémicas. El tratamiento resultó en una disminución específica a antígeno de la capacidad proliferativa de los esplenocitos y las células del nódulo linfático inguinal, que era críticamente dependiente de la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  y se asoció con una inducción significativa de células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup>. Este enfoque de bacterias que suministran antígenos tiene la 35 capacidad de potenciar la tolerancia oral incluso en el contexto de una hipersensibilidad establecida. Por lo tanto, es aplicable para el tratamiento de la enfermedad celíaca y otras enfermedades autoinmunes y/o alérgicas. La eficacia de la invención se demostró en modelos de ratón con enfermedades autoinmunes y alérgicas, así como en el contexto de la activación inmune de agentes terapéuticos.

40 Un primer aspecto de la invención se refiere a inducir tolerancia inmune a un antígeno, que comprende el suministro a la mucosa de dicho antígeno mediante una bacteria *Lactococcus sp.*

Preferiblemente la bacteria *Lactococcus sp.* que es preferiblemente una *Lactococcus lactis*, se formula como un medicamento, alimento médico o nutracéutico y está presente de forma continua en el sujeto humano.

45 El antígeno se suministra por dicho microorganismo. Preferiblemente dicho antígeno se suministra por un microorganismo que secreta antígeno o que exhibe antígeno o un antígeno intracelular. Por lo tanto, la invención abarca realizaciones en las que dicho antígeno se exhibe en la superficie de dicho microorganismo que expresa antígeno o en el que se secreta dicho antígeno, o dicho antígeno se libera a la digestión.

La presente invención se refiere al dicho microorganismo que induce tolerancia inmune.

Preferiblemente, dicha tolerancia inmune es tolerancia a la mucosa.

#### Mucosa

50 La mucosa como se utiliza aquí puede ser cualquier mucosa, tal como mucosa oral, mucosa rectal, mucosa uretral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa bucal, mucosa pulmonar y mucosa nasal. El suministro a mucosa como se utiliza en toda la solicitud abarca el suministro a la mucosa. El suministro a la mucosa oral incluye rutas de suministro bucal, sublingual y gingival. De acuerdo con lo anterior, el suministro a la mucosa se selecciona del grupo que consiste

de suministro rectal, suministro bucal, suministro pulmonar, suministro ocular, suministro nasal, suministro vaginal y suministro oral. Preferiblemente, dicho suministro a la mucosa es suministro oral y dicha tolerancia es tolerancia oral.

5 La tolerancia a la mucosa como se utiliza aquí en toda la solicitud es la inhibición de la respuesta inmune específica a un antígeno en un animal (que incluye humanos), después de que dicho animal se ha expuesto a dicho antígeno a través de la ruta de la mucosa. Preferiblemente, dicha tolerancia a la mucosa es tolerancia sistémica. La exposición posterior del antígeno puede ser cualquier exposición conocida por los expertos en la técnica, tal como exposición por inyección parenteral, suministro a la mucosa o producción endógena tal como en el caso de autoantígenos. La tolerancia oral es la inhibición de la respuesta inmune específica a un antígeno en un animal (que incluye humanos), después de que dicho animal ha sido expuesto a dicho antígeno a través de la ruta oral. La tolerancia oral a dosis bajas es la tolerancia oral inducida por dosis bajas de antígenos, y se caracteriza por la supresión inmune activa, mediada por células T reguladoras sensibles a ciclofosfamida que pueden transferir tolerancia a anfitriones sin tratamiento previo. La tolerancia oral a altas dosis es la tolerancia oral inducida por altas dosis de antígenos, es insensible al tratamiento con ciclofosfamida y conduce a la inducción de la hiposensibilidad de células T a través de anergia y/o eliminación de células T específicas a antígeno. La diferencia en la sensibilidad a la ciclofosfamida se puede utilizar para hacer una distinción entre tolerancia a dosis baja y alta dosis (Strobel et al., 1983). Preferiblemente, dicha tolerancia oral es una dosis baja de tolerancia oral como se describe por Mayer y Shao (2004b).

20 La tolerancia inmune inducida puede ser por lo menos 1.5, preferiblemente 2, más preferiblemente 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción. Alternativamente, dicho antígeno se tolera por lo menos 1.5, 2, 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción. La inducción de tolerancia inmune se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, dicha inducción de tolerancia inmune se puede medir mediante modulación de un nivel de citoquina en dicho animal. Como tal, la modulación puede ser un aumento de un nivel de citoquina, por ejemplo dicho aumento de un nivel de citoquina es por lo menos 1.5, 2, 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción, por ejemplo IL-10 o TGF- $\beta$ . Alternativamente, dicha modulación es una reducción del nivel de un nivel de citoquina particular, por ejemplo dicha reducción del nivel de citoquina es por lo menos 1.5, 2, 3 veces o más en relación con antes de dicha inducción, por ejemplo IL-12, IL-17 y IFN- $\gamma$ . Las citoquinas que se modulan se pueden seleccionar de cualesquier citoquinas importantes, preferiblemente dichas citoquinas se seleccionan del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , MCP-1, TGF- $\beta$ , RANK-L y Flt3L.

#### Construcciones, suministro e integración

30 En la presente invención, el microorganismo suministra el antígeno en el sitio deseado, es decir, la mucosa. El microorganismo expresa dicho antígeno, después de lo cual el antígeno se expone sobre la superficie celular o se secreta. Por lo tanto, en una realización preferida, el microorganismo, tal como *L. lactis*, comprende un vector de expresión capaz de expresar el antígeno heterólogo, por ejemplo el antígeno utilizado para inducir tolerancia inmune, intracelularmente, secretado y/o de tal manera que el antígeno heterólogo se expone sobre la superficie celular bajo condiciones presentes en la mucosa deseada, por ejemplo tal como en el tracto gastrointestinal. El microorganismo, por ejemplo *L. lactis*, puede comprender vectores de expresión capaces de expresar el antígeno heterólogo intracelular, secretado y/o de tal manera que el antígeno heterólogo se expone sobre la superficie celular en un grado suficiente para inducir tolerancia inmune. Se prevé un grado de expresión tan alto como sea posible sin dañar la viabilidad de la célula o el anfitrión que se va a tratar. Con una expresión más alta, se pueden requerir dosis menos frecuentes y más bajas para propósitos de tolerancia. Naturalmente, el régimen de dosificación dependerá no solo de la cantidad de antígeno sino también del tipo de antígeno y de la presencia o ausencia de otros factores estimulantes o supresores de inmunogenicidad en la composición.

45 Habitualmente, el sistema de expresión comprenderá una construcción genética que comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno deseado, preferiblemente unida operativamente a un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia en el microorganismo anfitrión. Adecuadamente, el antígeno que se va a expresar se puede codificar mediante una secuencia de ácidos nucleicos que se adapta al uso de codón preferido del anfitrión. La construcción puede contener adicionalmente (todos) otros elementos adecuados, incluidos potenciadores, secuencias de iniciación de transcripción, secuencias señal, genes informadores, secuencias de terminación de transcripción, etc., que pueden funcionar en el anfitrión seleccionado, como es conocido por los expertos en la técnica. La construcción preferiblemente está en una forma adecuada para la transformación del anfitrión y/o en una forma que puede mantenerse de manera estable en el anfitrión, tal como un vector, plásmido o minicromosoma. Vectores adecuados que comprenden ácido nucleico para la introducción en microorganismos, por ejemplo bacterias, se pueden elegir o construir, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, fragmentos de terminación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, por ejemplo fago, o fagémido, según sea apropiado. Para más detalles, véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. En una realización preferida, las secuencias de codificación para el polipéptido biológicamente activo y el antígeno están contenidas en un operón, es decir, una construcción de ácido nucleico para la expresión multi-cistrónica. En un operón, la transcripción del promotor da como resultado un ARNm que comprende más de una secuencia de codificación, cada una con su propio sitio de unión a ribosomas situado de forma adecuada

corriente arriba. Por lo tanto, más de un polipéptido se puede traducir a partir de un solo ARNm. El uso de un operón permite coordinar la expresión del polipéptido biológicamente activo y el antígeno que se va a coordinar. Más preferiblemente, se utiliza una construcción de grado alimenticio.

5 En una realización los microorganismos transfectados de forma estable, es decir, microorganismos en los que el gen que codifica el antígeno se ha integrado en el genoma del anfitrión. Las técnicas para establecer microorganismos transfectados de forma estable son conocidas en la técnica. Por ejemplo, el gen de interés se puede clonar en el genoma del anfitrión mediante recombinación homóloga. Preferiblemente, un gen esencial del anfitrión se ve interrumpido por el evento de recombinación homóloga, tal como la supresión del gen, una o más sustituciones de aminoácidos que conducen a una forma inactiva de la proteína codificada por el gen esencial, o una mutación del marco de lectura que resulta en una forma truncada de la proteína codificada por el gen esencial. En una realización, el gen esencial es el gen *thyA*. Una técnica preferida se describe en el documento WO02/090551. El plásmido transformante puede ser cualquier plásmido, siempre que no pueda complementar el gen esencial interrumpido, por ejemplo *thyA*. El plásmido puede ser uno auto-replicante, preferiblemente portador de uno o más genes de interés y uno o más marcadores de resistencia, o el plásmido es un plásmido integrativo. En el último caso, el propio plásmido integrativo se puede utilizar para romper el gen esencial, al provocar la integración en el locus del gen esencial, por ejemplo sitio de *thyA*, debido a que se interrumpe la función del gen esencial, por ejemplo el gen *thyA*. Preferiblemente, el gen esencial, tal como el gen *thyA*, se reemplaza por recombinación homóloga doble mediante un casete que comprende el gen o genes de interés, flanqueado por secuencias objetivo que se dirigen a la inserción del gen esencial, tal como el sitio objetivo *thyA*. Se apreciará que estas secuencias de direccionamiento son suficientemente largas y suficientemente homólogas para permitir la integración del gen de interés en el sitio objetivo.

Por lo tanto, una construcción genética puede estar presente en la célula anfitriona extracromosómicamente, preferiblemente que se replica de manera autónoma utilizando un propio origen de replicación, o se puede integrar en el cromosoma de *Lactococcus*. En el último caso, se puede integrar una sola o múltiples copias de dicho ácido nucleico; la integración puede ocurrir en un sitio aleatorio del cromosoma o, como se describió anteriormente, en un sitio predeterminado del mismo, preferiblemente en un sitio predeterminado, tal como, en un ejemplo no limitante preferido, en el locus *thyA* de *Lactococcus*, por ejemplo, *Lactococcus lactis*.

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

30 En un ejemplo, la inserción de la construcción genética en sitios particulares dentro de un genoma, por ejemplo el cromosoma de una célula anfitriona se puede facilitar por recombinación homóloga. Por ejemplo, la construcción genética de la invención puede comprender una o más regiones de homología con dicho sitio de integración dentro del genoma, por ejemplo, un cromosoma, de la célula anfitriona. La secuencia en dicho genoma, por ejemplo cromosoma, el sitio puede ser natural, es decir, como ocurre en la naturaleza, o puede ser una secuencia exógena introducida por ingeniería genética previa.

Por ejemplo, dicha(s) región(es) de homología pueden tener por lo menos 50 pb, preferiblemente por lo menos 100 pb, por ejemplo, por lo menos 200 pb, más preferiblemente por lo menos 300 pb, por ejemplo, por lo menos 400 pb, incluso más preferiblemente por lo menos 500 pb, por ejemplo, por lo menos 600 pb o por lo menos 700 pb, aún más preferiblemente por lo menos 800 pb, por ejemplo, por lo menos 900 pb, o por lo menos 1000 pb o más.

40 En un ejemplo preferido, se pueden incluir dos regiones de homología, una que flanquea cada lado de las unidades de expresión relevantes presentes en la construcción genética de la invención. Dicha configuración puede insertar ventajosamente las secuencias relevantes, es decir, por lo menos las que codifican y efectúan la expresión del antígeno de interés, en células anfitrionas. Las formas de realizar la recombinación homóloga, especialmente en anfitriones bacterianos, y la selección de recombinantes, son generalmente conocidas en la técnica.

45 Los métodos de transformación de microorganismos son conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, transformación de protoplastos y electroporación.

Se puede lograr un alto grado de expresión utilizando señales de expresión y/o secreción homólogas sobre los vectores de expresión presentes en el microorganismo, por ejemplo *L. lactis*. De manera adecuada, son útiles las señales que regulan la expresión presentes en las construcciones en los Ejemplos. Otras señales de expresión serán evidentes para el experto en la técnica. El vector de expresión se puede optimizar para la expresión dependiendo del microorganismo, por ejemplo se incorpora *L. lactis*. Por ejemplo, se conocen vectores de expresión específicos que dieron niveles suficientes de expresión en *Lactococcus*, *Lactobacillus lactis*, *casei* y *plantarum*. Más aún, se conocen sistemas que se han desarrollado para la expresión de antígenos heterólogos en la bacteria *Lactococcus lactis* de calidad alimentaria no patógena, no colonizante y no invasiva (véase la patente británica GB2278358B). Una construcción particularmente preferida de acuerdo con la invención comprende el vector de expresión de múltiples copias descrito en el documento PCT/NL95/00135 (WO-A-96/32487), en el que se ha incorporado la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno. Dicha construcción es particularmente adecuada para la expresión de un antígeno deseado en una bacteria de ácido láctico, en particular en un *Lactobacillus*, a un alto nivel de expresión, y también se puede utilizar ventajosamente para dirigir el producto expresado a la superficie de la célula bacteriana. Las construcciones (por ejemplo, del documento

PCT/NL95/00135) se pueden caracterizar porque la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno está precedida por una secuencia de ácidos nucleicos 5' no traducida que comprende por lo menos la secuencia mínima requerida para reconocimiento de ribosoma y estabilización de ARN. Esto puede ir seguido de un codón de iniciación de traducción que puede estar seguido (inmediatamente) por un fragmento de por lo menos 5 codones de la parte terminal 5' de la secuencia de ácidos nucleicos traducida de un gen de una bacteria de ácido láctico o un equivalente estructural o funcional del fragmento. El fragmento también puede ser controlado por el promotor. El alto nivel regula la expresión de genes heterólogos en el anfitrión y el acoplamiento de la expresión a la secreción. En una realización preferida adicional, la polimerasa de ARN bacteriófago T7 y su promotor afín se utilizan para desarrollar un potente sistema de expresión de acuerdo con el documento WO93/17117, que se incorpora aquí como referencia. Preferiblemente, el plásmido de expresión se deriva de pT1NX.

Un promotor empleado de acuerdo con la presente invención preferiblemente se expresa constitutivamente en la bacteria. Los inventores observaron que la expresión constitutiva del antígeno resulta en un aumento de la tolerancia inmune en contraste con la expresión inducible. Adicionalmente, el uso de un promotor constitutivo evita la necesidad de suministrar un inductor u otra señal reguladora para que tenga lugar la expresión. Preferiblemente, el promotor dirige la expresión a un nivel en el que la célula anfitriona bacteriana permanece viable, es decir, retiene alguna actividad metabólica, incluso si no se mantiene el crecimiento. Ventajosamente, entonces, dicha expresión puede estar en un nivel bajo. Por ejemplo, cuando el producto de expresión se acumula intracelularmente, el nivel de expresión puede conducir a la acumulación del producto de expresión a menos de aproximadamente 10% de proteína celular, preferiblemente aproximadamente o menos de aproximadamente 5%, por ejemplo aproximadamente 1-3%. El promotor puede ser homólogo a la bacteria empleada, es decir, una que se encuentra en esa bacteria en la naturaleza. Por ejemplo, un promotor Lactocócico se puede utilizar en un Lactococcus. Un promotor preferido para utilizar en Lactococcus lactis (u otros Lactococci) es "P1" derivado del cromosoma de Lactococcus lactis (Waterfield, N R, Lepage, R W F, Wilson, P W, et al. (1995). El aislamiento de promotores lactocócicos y su uso en la investigación de la síntesis de luciferasa bacteriana en Lactococcus lactis. Gene 165 (1), 9-15). Otro promotor preferido es el promotor usp45.

La construcción o construcciones de ácido nucleico puede comprender una secuencia de señal secretora. Por lo tanto, en una realización preferida, el ácido nucleico que codifica un antígeno puede proporcionar la secreción de dicho antígeno (al acoplar apropiadamente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia única a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno). La capacidad de una bacteria que alberga el ácido nucleico para secretar el antígeno se puede probar in vitro en condiciones de cultivo que mantienen la viabilidad del organismo. Las secuencias de señal de secreción preferidas incluyen cualquiera de aquellas con actividad en organismos Gram positivos tales como Bacillus, Clostridium y Lactobacillus. Dichas secuencias pueden incluir el líder de secreción de  $\alpha$ -amilasa de Bacillus amyloliquefaciens o el líder de secreción de la enzima estafiloquinasa secretada por algunas cepas de Staphylococcus, que se sabe funcionan tanto en anfitriones Gram-positivos como Gram- "Gene Expression Using Bacillus", Rapoport (1990) Current Opinion in Biotechnology 1:21-27), o secuencias líderes de numerosas otras enzimas Bacillus o proteínas de la capa S (véase pp341-344 de Harwood and Cutting, "Molecular Biological Methods for Bacillus", John Wiley & Co. 1990). Preferiblemente, dicha señal de secreción se deriva de usp45 (Van Asseldonk et al., 1993 Mol. Gen. Genet. 240:428- 434). Preferiblemente, dicho antígeno se secreta constitutivamente.

En una realización alternativa, las secuencias de codificación para el polipéptido biológicamente activo y el antígeno son parte del mismo vector de ácido nucleico, o vectores separados, y están individualmente bajo el control regulador de promotores separados. Los promotores pueden ser iguales o diferentes. Se describe en el presente documento Una construcción o vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación para un polipéptido biológicamente activo y una secuencia de codificación para un antígeno en el que cada secuencia de codificación está bajo el control de un promotor para la expresión en un anfitrión no invasivo, por ejemplo *Lactococcus*, ya sea como operón o no.

#### Antígenos

La secuencia que codifica el antígeno se puede obtener de cualquier fuente natural y/o se puede preparar sintéticamente utilizando técnicas de síntesis de ADN bien conocidas. La secuencia que codifica el antígeno luego se puede incorporar (por ejemplo) en un vector de expresión adecuado para proporcionar una construcción genética de la invención, que luego se utiliza para transformar o transfectar el anfitrión deseado. El recombinante obtenido de esa manera se puede cultivar luego, sobre el cual las células cosechadas se pueden utilizar para formular la composición, opcionalmente después de otras etapas de purificación y/o procesamiento, tales como liofilización para formar un polvo.

Un antígeno puede ser cualquier antígeno conocido por el experto en la técnica. Un antígeno como se utiliza en este documento en toda la solicitud es preferiblemente cualquier sustancia que provoque una respuesta inmune cuando se introduce en el cuerpo de un animal, en el que dicha respuesta inmune puede ser una respuesta mediada por células T y/o una respuesta mediada por células B. El antígeno puede comprender un epítipo de células T y/o un epítipo de células B. La longitud del antígeno no es particularmente limitante, con la condición de que dicho antígeno se pueda expresar en el microorganismo de la invención. El antígeno puede ser una proteína o una parte de la misma, tal como un polipéptido o un péptido. Los antígenos de acuerdo con la invención incluyen epítopos lineales y/o conformacionales. Las respuestas mediadas por células T cubren las respuestas Th1, Th2 y/o Th17. El antígeno puede ser cualquier antígeno, tal como, pero no limitado a, alérgenos (que incluyen alérgenos alimentarios), aloantígenos, autoantígenos, autoantígenos y moléculas terapéuticas o antígenos que inducen una respuesta inmune. Preferiblemente, dicho

antígeno está implicado en la inducción de enfermedades relacionadas con la respuesta inmune y dicho antígeno está implicado en la inducción de asma alérgica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, uveítis autoinmune, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, artritis reumatoide, alergia a alimentos, enfermedad celíaca o enfermedad de injerto contra anfitrión.

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

10 Las células T reguladoras (Treg) desempeñan una función crítica en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia oral. La inducción de Treg es un objetivo principal de la inmunoterapia para varias enfermedades autoinmunes, alérgicas e inflamatorias. Las estrategias actuales para la inducción terapéutica de células supresoras específicas de antígeno enfrentan importantes obstáculos, y usualmente requieren técnicas extenuantes para aislar, manejar y transferir cantidades adecuadas de células reguladoras. El microorganismo, por ejemplo El sistema de suministro de antígeno *L. lactis* de la presente invención evita estos problemas e induce efectivamente la Treg específica de antígeno. En la presente invención, se demostró que la inducción de Treg se puede lograr al exponer el sistema inmunitario de la mucosa a dosis bajas de antígeno. La exposición a bajas dosis de antígeno es preferiblemente una exposición continua. Por lo tanto, la presente invención se refiere a antígenos que inducen y/o expanden células Treg, preferiblemente células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> y CD8<sup>+</sup>.

15 Se demostró adicionalmente en la presente invención que las células Treg que se indujeron y/o expandieron por los antígenos de acuerdo con la invención funcionan a través de un mecanismo dependiente de TGF-β y/o IL-10. Anteriormente se ha proporcionado evidencia de que TGF-β desempeña una función crítica en la tolerancia oral, así como en el desarrollo de Treg inducida periférica. Los antígenos inmunodominantes pueden estimular la expresión endógena de TGF-β y/o IL-10.

20 Más aún, se demostró que las células Th3 productoras de TGF-β específicas de antígeno impulsan la diferenciación de las células reguladoras de Foxp3<sup>+</sup> específicas de antígeno en la periferia. Adicionalmente, se ha informado sobre la conversión dependiente de TGF-β de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> periféricas en células supresoras CD25<sup>+</sup>, CD45RB<sup>-bajo</sup>. Se mostró que la tolerancia oral inducida por Ag conjugado con CTB se asocia con un aumento en TGF-β mediante la generación tanto de células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> como Foxp3<sup>+</sup> y Foxp3-CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>. Estos datos sugieren una función clave para Treg 'adaptativa' de Foxp3<sup>+</sup> en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia oral. También mostramos una inducción de Foxp3 en la mucosa significativa. Más aun, la célula T reguladora inducida por "la mucosa" tiende a ser específica de antígeno ya que *L. lactis* sola es incapaz de inducir esta regulación positiva de Foxp3 dentro de la GALT. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere preferiblemente a células Treg Foxp3<sup>+</sup>.

25 La presente invención demostró adicionalmente que las células Treg que se indujeron y/o expandieron por *Lactococcus* que comprenden un ácido nucleico que codifica un antígeno disminuyeron la inflamación, en particular en el bazo y las células de nódulos linfáticos inguinales. Más aún, se redujo la producción de IFN-γ y IL-12. De acuerdo con lo anterior, el microorganismo para uso en la presente invención puede reducir la producción de IFN-γ y IL-12 endógena y/o estimular la expresión endógena de TGF-β y/o IL-10. Más aún, la presente invención puede reducir la proliferación de células de bazo y/o de ganglios linfáticos inguinales y/o suprimir la respuesta de célula T específica a antígeno inflamatoria.

30 Se apreciará que ciertas isoformas HLA-DQ se asocian más comúnmente con ciertas enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, la inflamación crónica del intestino delgado que define la enfermedad celíaca se caracteriza por una pérdida de tolerancia a los péptidos del gluten ingeridos y se asocia fuertemente con una respuesta de células T restringida a HLA-DQ2 o HLA-DQ8. La expresión de HLA-DQ2 o HLA-DQ8 es necesaria para la expresión de la celiaquía y confiere hasta 40% del riesgo genético en las poblaciones occidentales. Uno de los aspectos más importantes en la patogénesis de la celiaquía es la activación de una respuesta inmune T-ayudadora 1, que surge cuando las células presentadoras de antígeno que expresan moléculas HLA-DQ2/DQ8 presentan péptidos de gluten a las células T CD4<sup>+</sup>.

35 DQ8 se destaca debido a su fuerte asociación no solo con la enfermedad celíaca sino también con la diabetes juvenil. También se une los alelos HLA-DR que están implicados en la RA y pueden aumentar el riesgo. HLA-DQ no se propaga de manera uniforme y ciertas poblaciones corren un mayor riesgo; sin embargo, ese riesgo a menudo depende del entorno (consumo de gluten) y el aumento de la prevalencia de algunas enfermedades puede ser el resultado de cambios de entornos individuales de entornos de bajo riesgo a entornos de mayor riesgo.

40 El HLA DQ8 de acuerdo con la invención es la representación serotípica de un haplotipo DQA1 :DQB1. DQ8 representa los haplotipos DQA1\*0301:DQB1\*0302, DQA1\*0302:DQB1\*0302, o DQA1\*0303:DQB1\*0302. Estos haplotipos se asocian con algunas de las enfermedades autoinmunes más comunes conocidas. El DQA1\*0301:DQB1\*0302 es el más frecuente de estos 3 haplotipos y representa aproximadamente 80% deL DQ8 global. Por lo tanto la presente invención se refiere a antígenos reconocidos a través de haplotipos DQA1\*0301: DQB1\*0302, DQA1\*0302:DQB1\*0302, y/o DQA1\*0303:DQB1\*0302, mencionados como "epitopo DQ8".

45 El HLA-DQ2 se expresa en más del 90% de las personas con enfermedad celíaca. HLA DR3-DQ2 es la representación serotípica de un haplotipo HLA-DRB1: DQA1:DQB1. DR3-DQ2 representa principalmente el haplotipo DRB1\*0301:

DQA1\*0501: DQB1\*0201. Es relativamente abundante en el hemisferio occidental. DQ2 se codifica por los alelos DQB1\*02 en combinación con otros alelos alfa. Las dos cadenas  $\beta$  DQ2 más comunes son muy similares. La presente invención por lo tanto se refiere a antígenos reconocidos a través de haplotipos DQB1\*0201, DQB1\*0202 y/o DQB1\*0203, mencionados como "epítipo DQ2".

5 El microorganismo para uso en la presente invención preferiblemente comprende un ac nucleico que codifica un antígeno derivado de una glicoproteína. Preferiblemente, dichos antígenos se derivan de gliadina, preferiblemente  $\alpha$ -gliadina y/u hordeína. Las gliadinas, que se pueden subdividir en las  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas, y la hordeína son bien conocidas en la técnica, y sus secuencias se pueden recuperar fácilmente a través de colecciones de dominio público, tales como NCBI. Preferiblemente, dicha  $\alpha$ -gliadina se deriva de *Triticum*, tal como *T. aestivum* o *T. turgidum*.

10 En otra realización preferida dicho antígeno es Factor VIII.

La presente invención demuestra que las células T CD4<sup>+</sup> reconocen péptidos de gluten nativos en el contexto de DQ2 o DQ8.

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

15 QYPSGQGSFQPSQNPQA, que corresponde a los residuos 203-220 de la secuencia recuperable a través de la entrada UniProtKB/TrEMBL Q9M4L6 (SEQ ID NO: 4).

Dicho epítipo DQ8 natural preferiblemente se codifica por la secuencia de nucleótidos 5'-caa tac cca tca ggt caa ggt tca ttc caa cca tca caa caa aac cca caa gct-3'. (SEQ ID NO: 3)

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

20 LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF, que corresponde a los residuos 57-89 de la secuencia recuperable a través de la entrada UniProtKB/TrEMBL Q9M4L6 (SEQ ID NO: 8)

Dicho epítipo DQ2 preferiblemente se codifica por la secuencia de nucleótidos

5'-tta caa tta caa cca ttc cca caa cca caa tta cca tac cca tta cca tac cca caa cca caa tta cca tac cca caa cca cca ttc (SEQ ID NO: 7)

25 Los antígenos son comúnmente desamidados en los intestinos mediante por ejemplo la transglutaminasa tisular endógena. Los antígenos desamidados son más inmunes reactivos y fácilmente reconocibles que los antígenos que no se desamidán. La presencia de transglutaminasa de tejido endógeno es indiferente en caso de que los antígenos se desaminen por otros medios. En una realización, la presente invención se refiere a antígenos desamidados, codificados por secuencias de nucleótidos en las que los codones para residuos de glutamina en epítipos se reemplazan preferiblemente por codones para residuos de ácido glutámico.

30 En particular, la presente invención se refiere al epítipo DQ8 desaminado

QYPSGEGSFQPSQENPQA (SEQ ID NO: 2).

Dicho epítipo DQ8 desaminado preferiblemente se codifica por la secuencia de nucleótidos 5'-caa tac cca tca ggt gaa ggt tca ttc caa cca tca caa gaa aac cca caa gct-3'. (SEQ ID NO: 1)

En particular, la presente invención se refiere al epítipo DQ2 desaminado

35 LQL QPF PQP ELP YPQ PQL PYP QPE LPY PQP QPF (SEQ ID NO: 6)

Dicho epítipo DQ2 desaminado preferiblemente se codifica por la secuencia de nucleótidos

5'-tta caa tta caa cca ttc cca caa cca gaa tta cca tac cca tta cca tac cca caa cca gaa tta cca tac cca caa cca cca ttc (SEQ ID NO: 5)

40 Se demostró adicionalmente que la presencia de secuencias adicionales, tales como un tag, a las secuencias de epítipos no influyen la respuesta inmune. De acuerdo con lo anterior, en realizaciones adicionales, dicho epítipo puede comprender aminoácidos adicionales, tal como por ejemplo 50 aminoácidos, 43, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácido(s). Por lo tanto, la presente invención se refiere a epítipos DQ8 que comprenden a l o sumo 50 aminoácidos adicionales. En una realización adicional, la presente invención se refiere a la secuencia de aminoácidos GAPVPYPDPLEPRQYPSGEGSFQPSQENPQA (SEQ ID NO: 16), que comprenden un epítipo DQ8 y un e-tag (GAPVPYPDPLEPR (SEQ ID NO: 31)).

45 epítipo DQ8 y un e-tag (GAPVPYPDPLEPR (SEQ ID NO: 31)).

Respuesta inmune

Una respuesta inmune relacionada con la enfermedad como se utiliza en este documento es una enfermedad provocada por una respuesta inmune no deseada del cuerpo contra un antígeno, por lo cual dicho antígeno puede ser ya sea un antígeno heterólogo o un auto-antígeno. Las Respuestas inmunes relacionadas con la enfermedad incluyen,

pero no se limitan a reacción alérgica que incluye alergia a alimentos, enfermedad celíaca, asma alérgica, uveítis autoinmune, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, artritis reumatoide, diabetes tipo I y esclerosis múltiple. Las respuestas inmunes relacionadas con la enfermedad también incluyen reacciones inmunes no deseadas tales como enfermedad de injerto contra anfitrión o activación inmune de medicación tal como la proeducción de anticuerpos contra el Factor VIII endógeno. Preferiblemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de asma alérgica, alergia a alimentos, enfermedad celíaca, y diabetes tipo I. Por lo tanto se apreciará que las respuestas inmunes relacionadas con la enfermedad incluyen, pero no se limitan a reacción alérgica que incluye alergia a alimentos, enfermedad celíaca, asma alérgica, uveítis autoinmune, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, artritis reumatoide, diabetes tipo I y esclerosis múltiple. Las respuestas inmunes relacionadas con la enfermedad también incluyen reacciones inmunes no deseadas tales como enfermedad de injerto contra anfitrión o activación inmune de medicación tal como la producción de anticuerpo contra el Factor VIII no endógeno. Preferiblemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de asma alérgica, alergia a alimentos, enfermedad celíaca, enfermedad de injerto contra anfitrión, y diabetes tipo I.

De acuerdo con la presente invención el término "inmunodominante" se refiere a los antígenos principales que inducen una respuesta inmune.

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

Se describe en este documento un método para inducir tolerancia inmune a un antígeno, que comprende suministro a la mucosa de dicho antígeno por un microorganismo en combinación con el suministro a la mucosa de un microorganismo que produce un compuesto inmunomodulador. El compuesto inmunomodulador y el antígeno se pueden administrar por el mismo microorganismo o puede ser un microorganismo diferente.

#### Medicamento y administración

Compuesto significa cualquier sustancia química de compuesto o complejo biológico, que incluye moléculas orgánicas e inorgánicas simples o complejas, péptidos, peptidomiméticos, proteínas, complejos proteicos, anticuerpos, carbohidratos, ácidos nucleicos o derivados de los mismos. Un compuesto inmunomodulador es un compuesto que modifica la función del sistema inmunitario. Un compuesto inmunomodulador como se utiliza en este documento es un compuesto que induce tolerancia; la inducción la tolerancia se puede obtener, como ejemplo no limitante, de manera directa al inducir células T reguladoras tales como Treg, Tr1 o Th3, o al desplazar el equilibrio Th1/Th2 hacia Th1 o Th2, o al inhibir Th 17, o de forma indirecta, mediante la activación de células dendríticas inmaduras para tolerizar células dendríticas y/o inhibir la respuesta inmune Th2 que induce la expresión de factores de "coestimulación" sobre células dendríticas maduras. Los compuestos inmunomoduladores e inmunosupresores son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, metabolitos bacterianos tales como metabolitos de espergualina, hongos y estreptomicinas tales como tacrolimus, rapamicina o ciclosporina, citoquinas inmunosupresoras tales como IL -4, IL-10, IFN $\gamma$  TGF $\beta$  (como adyuvante selectivo para células T reguladoras) Flt3L, TSLP, CTB y Rank-L (como anticuerpos y/o antagonistas inductores de DC tolerogénicos selectivos tales como anti-CD40L, anti-CD25, anti-CD20, anti-IgE, anti-CD3, anti-IL-6 (o IL6R) y proteínas, péptidos o proteínas de fusión tales como la proteína de fusión agonista CTL-4 Ig o CTLA-4.

De este modo, el compuesto inmunomodulador puede ser cualquier compuesto inmunomodulador conocido por los expertos en la técnica. Preferiblemente, dicho compuesto inmunomodulador es un compuesto inmunosupresor, incluso más preferiblemente dicho compuesto es una citoquina o anticuerpo inmunosupresor. Preferiblemente, dicha citoquina inmunosupresora es una citoquina o anticuerpo potenciador de tolerancia. Los expertos en la técnica conocen las citoquinas inmunosupresoras e incluyen, entre otras, IL-4, IL-10, IFN- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , como adyuvante selectivo para las células T reguladoras; y Flt3L, TSLP, CTB y Rank-L, como inductores de DC tolerogénicos selectivos. Preferiblemente, dicha citoquina inmunosupresora se selecciona del grupo que consiste en IL-4, IL-10, IFN $\alpha$  y Flt3L. El experto en la técnica apreciará que la presente invención también se refiere a homólogos funcionales de la misma. Un homólogo funcional connota una molécula que tiene esencialmente la misma función o similar, por lo menos para los fines previstos, pero puede diferir estructuralmente. Aún más preferiblemente, dicha citoquina que potencia la tolerancia inmunosupresora es IL-10, o un homólogo funcional de la misma. Preferiblemente, dicho anticuerpo inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en anti-IL-2, anti-IL12, anti-IL6, anti-IFN- $\gamma$ .

Suministro como se utiliza en este documento significa cualquier método de suministro conocido por el experto en la técnica e incluye, pero no se limita a, formulaciones farmacéuticas recubiertas o no recubiertas del compuesto para suministrar, cápsulas, liposomas, cuerpos oleosos, partículas de polímero que comprenden o llevan el compuesto a suministrar o microorganismos que secretan, muestran o acumulan el compuesto para suministrar, opcionalmente en presencia de compuestos que pueden potenciar el suministro a la mucosa y/o la absorción de la mucosa.

Los compuestos o composiciones descritos en este documento se pueden administrar en forma pura, combinados con otros ingredientes activos, o combinados con excipientes o vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones orales generalmente incluirán un vehículo diluyente inerte o un vehículo comestible. Los agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas, enemas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma

tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente dispersante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal como aceite graso. Adicionalmente, las formas unitarias de dosificación pueden contener otros diversos materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca o agentes entéricos. Adicionalmente, el jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes, colorantes y aromatizantes. Se apreciará que la forma y el carácter del vehículo farmacéuticamente aceptable está dictado por la cantidad de ingrediente activo con el que se va a combinar, la ruta de administración y otras variables bien conocidas. El vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el receptor del mismo.

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

Preferiblemente, dicho antígeno y/o dicha citoquina inmunosupresora se expresa en bajas cantidades, preferiblemente a 0.1 µg o menos por dosis de bacterias administradas en un entorno experimental de ratones, dichas cantidades se traducirán en un entorno de enfermedad humana.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares, como se utilizan en el presente documento incluyen la mejora o eliminación de una enfermedad o afección mental desarrollada una vez que se ha establecido o el alivio de los síntomas característicos de dicha enfermedad o afección. Como se utiliza en el presente documento, estos términos también abarcan, dependiendo de la condición del paciente, prevenir la aparición de una enfermedad o afección o de síntomas asociados con una enfermedad o afección, que incluye la reducción de la gravedad de una enfermedad o afección o síntomas asociados con ella antes de la afección con dicha enfermedad o afección. Dicha prevención o reducción antes de la afección se refiere a la administración del compuesto o composición de la invención a un paciente que no está en el momento de la administración afectado por la enfermedad o afección. La "prevención" también abarca la prevención de la recurrencia o prevención de recaídas de una enfermedad o afección o de los síntomas asociados a la misma, por ejemplo después de un período de mejora. Debe quedar claro que las afecciones mentales pueden ser responsables de las molestias físicas. A este respecto, el término "tratar" también incluye la prevención de una enfermedad o afección física o la mejora o eliminación de la enfermedad o afección física desarrollada una vez que se ha establecido o el alivio de los síntomas característicos de dichas afecciones.

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

Se apreciará que el antígeno, se suministra o expresa en una cantidad terapéuticamente efectiva. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición de la presente invención que provocará un efecto o respuesta terapéutica o profiláctica deseada cuando se administre de acuerdo con el régimen de tratamiento deseado. Se observa que cuando el antígeno inmuno dominante está continuamente presente, la respuesta celular específica del antígeno inflamatorio se reduce aún más. Esta reducción es significativamente mayor en comparación con la administración del antígeno como tal, el microorganismo como tal o la presencia no continua del antígeno. El término "presente continuamente" o "presencia continuada" de acuerdo con la invención se refiere a la presencia constante o ininterrumpida de un antígeno de acuerdo con la invención en el sitio de la mucosa deseado, por ejemplo el sitio de la inflamación. La presencia del antígeno se puede medir mediante técnicas bien conocidas en el arte, tales como PCR, ELISA o técnicas de precipitación inmune, tales como por ejemplo detalladas en la sección de ejemplos y anteriormente. Más aún, la presencia de *L. lactis* puede ser una medida de la presencia del antígeno. También, los efectos provocados por el antígeno pueden ser una medida de la presencia del antígeno, como, por ejemplo, la presencia o el aumento de los niveles de TGF-β o IL-10 endógenos, o una disminución de los niveles de IFN-γ o IL-12, o la presencia de células Treg, tal como se describe en este documento, o una disminución de la capacidad proliferativa de los esplenocitos y las células de ganglios linfáticos de drenaje. De este modo se apreciará que los niveles del antígeno pueden variar, mientras que el antígeno se considera que está continuamente presente.

Preferiblemente, el microorganismo o composición para uso en la presente invención se proporciona en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, un comprimido, cápsula, enema o dosis de aerosol medida, de tal manera que se administra una única dosis al sujeto, por ejemplo un paciente.

Los ingredientes activos se pueden administrar de 1 a 6 veces al día, suficientes para exhibir la actividad deseada. Estas dosis diarias se pueden dar como una sola dosis una vez al día, o se pueden dar como dos o más dosis más

pequeñas a la misma o diferentes horas del día, que en total dan la dosis diaria especificada. Preferiblemente, el ingrediente activo se administra una o dos veces al día. Por ejemplo, una dosis puede tomarse por la mañana y una más tarde en el día.

5 En todos los aspectos de la invención, la dosis diaria de mantenimiento se puede dar durante un período clínicamente deseable en el paciente, por ejemplo desde 1 día hasta varios años (por ejemplo, durante toda la vida restante del mamífero); por ejemplo de aproximadamente (2 o 3 o 5 días, 1 o 2 semanas, o 1 mes) hacia y/o por ejemplo hasta aproximadamente (5 años, 1 año, 6 meses, 1 mes, 1 semana o 3 o 5 días). La administración de la dosis de mantenimiento diaria durante aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días o durante aproximadamente 1 semana a aproximadamente 1 año es típica. Otros constituyentes de las formulaciones líquidas pueden incluir conservantes, sales inorgánicas, ácidos, bases, tampones, nutrientes, vitaminas u otros productos farmacéuticos.

10 El microorganismo que suministra el antígeno se puede suministrar en una dosis de por lo menos  $10^4$  unidades formadoras de colonias (cfu) a  $10^{12}$  cfu por día, preferiblemente entre  $10^6$  cfu a  $10^{12}$  cfu por día., lo más preferiblemente entre  $10^9$  cfu y  $10^{12}$  cfu por día. De acuerdo con el método descrito en Steidler et al. (Science 2000), el antígeno y posiblemente el compuesto inmunomodulador de, por ejemplo de  $10^9$  se secreta a por lo menos 1 ng a 100 ng. A través de ELISA, conocido por un experto en la técnica, el experto en la materia puede calcular el intervalo de secreción de antígeno en relación con cualquier otra dosis de cfu.

15 El antígeno de puede en una dosis que induce una respuesta de dosis baja. Preferiblemente, dicho antígeno se suministra en una dosis de por lo menos 10 fg a 500 µg por día, preferiblemente entre 1 pg y 250 µg por día, más preferiblemente entre 100 pg y 200 µg por día, o preferiblemente 1 ng y 150 µg, o más preferiblemente 10 ng y 125 µg por día, incluso más preferiblemente 100 ng y 100 µg por día, incluso más preferiblemente 1 mg y 90 µg por día y aún más preferiblemente entre 10 µg y 75 µg por día, tal como, por ejemplo, 25 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg o 70 µg por día.

20 Preferiblemente, el microorganismo o composición de la presente invención se proporciona en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, una tableta, solución, cápsula o dosis de aerosol medida, de modo que se administra una única dosis al sujeto, por ejemplo un paciente.

25 Dependiendo del modo de administración, por ejemplo oral, o cualquiera de los descritos anteriormente, el experto en la técnica sabe cómo definir o calcular la dosis real que se administrará a un paciente. El experto en la conocerá cómo ajustar las dosis dependiendo del paciente, microorganismo, vector, etcétera.

30 El microorganismo para uso de la presente invención también puede tomar la forma de una sal, hidrato, solvato o metabolito farmacológicamente aceptable. Las sales farmacológicamente aceptables incluyen sales básicas de ácidos inorgánicos y orgánicos, que incluyen pero no se limitan a ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido málico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fenilacético, ácido mandélico y similares. Cuando se incluye la función ácida, tal como un grupo carboxi, los pares de cationes farmacéuticamente aceptables adecuados para el grupo carboxi son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica e incluyen cationes de amonio cuaternario, cuaternario alcalinos, alcalinotérreos y similares.

#### Microorganismo

35 Un microorganismo puede ser cualquier bacterias, levaduras u hongos. Un microorganismo puede ser un microorganismo no patógeno, que incluye un microorganismo probiótico. Los organismos probióticos son conocidos por los expertos en la técnica. Los organismos probióticos incluyen, pero no se limitan a, bacterias tales como *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp. y tales levaduras como la subespecie *bouardii* de *Saccharomyces cerevisiae*. Dicha bacteria es una bacteria de ácido láctico que se elige del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. En las realizaciones de la invención, el microorganismo es una bacteria de *Lactococcus*. En una realización preferida, dicho microorganismo es *Lactococcus lactis*.

40 Se ha descrito el suministro de proteínas heterólogas (es decir, proteínas bacterianas de ácido no láctico) por parte de bacterias de ácido láctico en la mucosa, que incluyen suministro oral y vaginal (Steidler and Rottiers, 2006; Liu et al., 2006), lo que hace que estas bacterias de ácido láctico sean extremadamente adecuadas para el suministro de dicho antígeno y posiblemente dicho compuesto inmunosupresor. *L. lactis* es una bacteria grampositiva no patógena, no invasiva y no colonizadora. Se genera una variedad de cepas de *L. lactis* genéticamente modificadas para la síntesis local y el suministro de proteínas inmunomoduladoras a la mucosa intestinal. Adicionalmente, se establece un sistema de contención biológica que hace que la aplicación clínica de *L. lactis* genéticamente modificada sea una estrategia factible.

45 En una realización preferida, dicho microorganismo es un mutante *thyA* de *Lactococcus lactis*. Una realización especialmente preferida utiliza un mutante *thyA* de *Lactococcus lactis*, en el que el gen que codifica el antígeno se ha utilizado para romper el gen *thyA*.

Nutracéuticos y alimentos médicos

Se apreciará que los microorganismos y composiciones de la invención se pueden utilizar como nutraceuticos, alimentos funcionales o médicos, o como aditivos en dichos nutraceuticos, alimentos funcionales o médicos. Otra realización proporciona un alimento o bebida, preferiblemente apto para el consumo humano, que está compuesto por un agente nutraceutico y aromatizante, en el que el compuesto nutraceutico está compuesto por un extracto de un producto agrícola.

Los nutraceuticos, ya sea en forma de extracto líquido o composición seca, son comestibles y pueden ser ingeridos directamente por humanos, pero preferiblemente se proporcionan a los humanos en forma de aditivos o suplementos nutricionales, por ejemplo, en forma de comprimidos del tipo vendido en tiendas de alimentos saludables, o como ingredientes en sólidos comestibles, más preferiblemente productos alimenticios procesados tales como cereales, panes, tofu, galletas, helados, pasteles, papas fritas, pretzels, queso, etc., y en líquidos bebibles, por ejemplo, bebidas tales como leche, refrescos, bebidas deportivas y jugos de frutas. Por lo tanto, en una realización, se proporciona un método para mejorar el valor nutricional de un alimento o bebida al intermezclar el alimento o bebida con un nutraceutico en una cantidad que sea efectiva para mejorar el valor nutricional del alimento o bebida.

Otra realización proporciona un método para mejorar el valor nutritivo de un alimento o bebida que comprende entremezclar un alimento o una bebida con un nutraceutico para producir un alimento o bebida mejorada nutricionalmente, en el que el nutraceutico se entremezcla en una cantidad efectiva para mejorar el valor nutricional del alimento o bebida, en el que el nutraceutico está compuesto por un extracto de un cultivo que comprende los antígenos de la presente invención, y en el que el alimento o bebida mejorada nutricionalmente puede comprender adicionalmente un agente aromatizante. Los agentes aromatizantes preferidos incluyen edulcorantes tales como azúcar, jarabe de maíz, fructosa, dextrosa, maltodextrina, ciclamatos, sacarina, fenil-alanina, xilitol, sorbitol, maltitol y edulcorantes a base de hierbas, por ejemplo, Estevia.

Los nutraceuticos descritos en este documento están destinados al consumo humano y, por lo tanto, los procesos para obtenerlos se realizan preferiblemente de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) y cualquier reglamentación gubernamental aplicable que rija dichos procesos. Los procesos especialmente preferidos utilizan solo solventes derivados naturalmente. Los nutraceuticos descritos en este documento preferiblemente contienen niveles relativamente altos de sustancias potenciadoras de la salud. Los nutraceuticos pueden entremezclarse entre sí para aumentar sus efectos potenciadores de la salud.

A diferencia de los nutraceuticos, los llamados "alimentos médicos" no están destinados a ser utilizados por el público en general y no están disponibles en tiendas o supermercados. Los alimentos médicos no son aquellos alimentos incluidos dentro de una dieta saludable para disminuir el riesgo de enfermedades, como los alimentos bajos en grasa o bajos en sodio, ni tampoco son productos para perder peso. Un médico prescribe un alimento médico cuando un paciente tiene necesidades nutricionales especiales con el fin de controlar una enfermedad o estado de salud, y el paciente está bajo la atención continua del médico. La etiqueta debe indicar claramente que el producto está destinado a ser utilizado para manejar un trastorno o afección médica específica. Un ejemplo de un alimento médico es un alimento médico nutricionalmente diverso diseñado para proporcionar apoyo nutricional específico para pacientes con afecciones inflamatorias crónicas. Los compuestos activos de este producto son, por ejemplo, uno o más de los compuestos descritos en este documento. Los alimentos funcionales pueden incluir aquellos alimentos incluidos dentro de una dieta saludable para disminuir el riesgo de enfermedades, tales como alimentos bajos en grasa o bajos en sodio, o productos para perder peso. Por lo tanto, la presente invención contempla un alimento o bebida que comprende un nutraceutico de acuerdo con la invención.

Aquellos expertos en la materia apreciarán que se pueden realizar numerosos cambios y modificaciones en las realizaciones preferidas de la invención. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas las variaciones equivalentes.

Adicionalmente, todos los términos utilizados en la descripción de los compuestos de la presente invención tienen su significado como es bien conocido en la técnica.

Las siguientes cláusulas proporcionan ilustración adicional de ciertos aspectos y realizaciones que se han divulgado de acuerdo con la presente divulgación:

1. Un microorganismo que secreta un antígeno para uso en el suministro a la mucosa para tratar una respuesta inmune relacionada con la enfermedad en un paciente, en el que dicha respuesta inmune relacionada con la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de asma alérgica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, uveítis autoinmune, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, artritis reumatoide, alergia a alimentos o enfermedad celíaca.

2. Una composición para uso en el suministro a la mucosa para tratar, prevenir y/o aliviar una respuesta inmune relacionada con la enfermedad seleccionada del grupo que consiste de asma alérgica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, uveítis autoinmune, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, artritis reumatoide, alergia a alimentos o enfermedad celíaca en un paciente, caracterizada porque dicha composición comprende por lo menos un microorganismo que secreta un antígeno.

3. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con la cláusula 1, o la composición para uso de acuerdo con la cláusula 2, en la que dicho microorganismo es bacteria o levadura de ácido láctico, más preferiblemente es *Lactococcus lactis* (LL).
- 5 4. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 o 3, en la que dicho antígeno se secreta constitutivamente.
5. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1, 3 o 4, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2, 3 o 4, en la que dicho microorganismo se administra diariamente.
- 10 6. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1, o 3 a 5, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 5, en la que dicho antígeno induce células T reguladoras (Treg).
7. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con la cláusula 6 o la composición para uso de acuerdo con la cláusula 6, en la que dichas células Treg con células Treg Foxp3+.
- 15 8. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 7, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 7, en el que dicho antígeno es un antígeno inmunodominante desaminado.
- 20 9. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 8, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 8, en el que dicho antígeno se reconoce en el contexto de HLA-DQ2 o -DQ8.
10. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 9, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 9, en el que dicho antígeno es  $\alpha$ -gliadina u hordeína.
- 25 11. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con la cláusula 10, o la composición para uso de acuerdo con la cláusula 10, en la que dicho antígeno comprende o consiste de la SEQ ID NO: 2, 4, 6 o 8.
12. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 11, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 11, en la que dicho antígeno reduce la proliferación de células del nódulo linfático de bazo e inguinal.
- 30 13. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 12, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 12, en la que dicho antígeno suprime la respuesta de célula T específica a antígeno inflamatoria.
- 35 14. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 13, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 13, en la que dicho suministro a la mucosa se selecciona del grupo que consiste de suministro rectal, suministro bucal, suministro pulmonar, suministro ocular, suministro nasal, suministro vaginal y suministro oral.
15. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 14, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 14, en la que dicho microorganismo se suministra durante por lo menos 1 semana, más preferiblemente durante por lo menos 1 mes o 1 año.
- 40 16. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 15, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 15, en la que dicho microorganismo se suministra por lo menos una vez al día, preferiblemente dos veces al día.
- 45 17. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 16, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 16, en la que dicho microorganismo se suministra en una dosis de por lo menos 10 femtogramos a 100 mg por día, tal como 100 fg a 10 mg por día, o 1 pg a 1 mg por día, o 10 pg a 100  $\mu$ g por día, o 100 pg a 10  $\mu$ g por día, o 1 ng a 1  $\mu$ g por día, o 10 ng a 100 mg por día.
18. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 17, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 17, en la que dicho microorganismo se suministra mediante pulverización, cápsula, aerosol, pastillas oblongas, bolo, comprimido, bolsitas, líquido, suspensión, emulsión o pastillas.
- 50 19. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 18, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 18, en la que dicho microorganismo o composición se formula como un medicamento, alimento médico o nutracéutico.

20. Método para tratar, prevenir y/o aliviar una respuesta inmune relacionada con la enfermedad en un paciente, que comprende el suministro a la mucosa de una composición que comprende un microorganismo que expresa un antígeno, en el que dicho antígeno se secreta, y en el que dicha composición se suministra diariamente.
- 5 21. El método de acuerdo con la cláusula 20, en el que dicho microorganismo es bacteria o levadura de ácido láctico, más preferiblemente es *Lactococcus lactis* (LL).
22. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 o 21, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de asma alérgica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, uveítis autoinmune, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, artritis reumatoide, alergia a alimentos o enfermedad celíaca.
23. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 22, en el que dicha secreción es constitutiva.
- 10 24. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 23, en el que dicho antígeno induce células T reguladoras (Treg).
25. El método de acuerdo con la cláusula 24, en el que dichas células Treg son células Treg Foxp3+.
26. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 25, en el que dicho antígeno es un antígeno desaminado inmunodominante.
- 15 27. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 26, en el que dicho antígeno se reconoce en el contexto de HLA-DQ2 o -DQ8.
28. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 27, en el que dicho antígeno es  $\alpha$ -gliadina o hordeína.
29. El método de acuerdo con la cláusula 28, en el que dicho antígeno comprende o consiste de la SEQ ID NO: 2, 4, 6 o 8.
- 20 30. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 29, en el que dicho antígeno reduce la proliferación de células del nódulo linfático de bazo e inguinal.
31. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 30, en el que dicho antígeno suprime respuesta de célula T específica a antígeno.
- 25 32. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 31, en el que dicho suministro a la mucosa se selecciona del grupo que consiste de suministro rectal, suministro bucal, suministro pulmonar, suministro ocular, suministro nasal, suministro vaginal y suministro oral.
33. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 32, en el que dicho microorganismo se suministra durante por lo menos 1 semana, más preferiblemente durante por lo menos 1 mes o 1 año.
- 30 34. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 33, en el que dicho microorganismo se suministra por lo menos una vez al día, preferiblemente dos veces al día.
- 35 35. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 34, en el que dicho microorganismo se suministra en una dosis de por lo menos 10 femtogramos a 100 mg por día, tal como 100 fg a 10 mg por día, o 1 pg a 1 mg por día, o 10 pg a 100  $\mu$ g por día, o 100 pg a 10  $\mu$ g por día, o 1 ng a 1  $\mu$ g por día, o 10 ng a 100 mg por día.
36. El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 20 a 35, en el que dicho microorganismo se suministra mediante pulverización, cápsula, aerosol, pastillas oblongas, bolo, comprimido, bolsitas, líquido, suspensión, emulsión o pastillas.
37. Composición que comprende un microorganismo, en la que dicho microorganismo secreta constitutivamente un antígeno, que está involucrado en la inducción de asma alérgica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, uveítis autoinmune, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, artritis reumatoide, alergia a alimentos o enfermedad celíaca.
- 40 38. La composición de acuerdo con la cláusula 37, en la que dicho microorganismo es bacteria o levadura de ácido láctico, más preferiblemente es *Lactococcus lactis* (LL).
39. La composición de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 37 o 38, en la que dicho microorganismo está presente en una dosis de por lo menos 10 femtogramos a 100 mg, tal como 100 fg a 10 mg, o 1 pg a 1 mg, o 10 pg a 100  $\mu$ g, o 100 pg a 10  $\mu$ g, o 1 ng a 1  $\mu$ g, o 10 ng a 100 mg.
- 45 40. Producto que comprende la composición de cualquiera de las cláusulas 37 a 39.
41. El producto de la cláusula 40, en el que dicho producto se selecciona del grupo que consiste de pulverizaciones, cápsulas, aerosoles, pastillas oblongas, bolo, comprimidos, bolsitas, líquidos, suspensiones, emulsiones o pastillas.

42. Medicamento, nutracéutico o alimento médico para tratar, prevenir, y/o aliviar una enfermedad o trastorno que involucra una respuesta inmune relacionada con la enfermedad que comprende por lo menos un microorganismo, en el que dicho microorganismo secreta constitutivamente un antígeno, que está involucrado en la inducción de asma alérgica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, uveítis autoinmune, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, artritis reumatoide, alergia a alimentos o enfermedad celíaca.

43. Medicamento, nutracéutico o alimento médico de acuerdo con la cláusula 42, en el que dicho microorganismo es bacteria o levadura de ácido láctico, más preferiblemente es *Lactococcus lactis* (LL).

44. El microorganismo que secreta un antígeno para uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 o 3 a 19, o la composición para uso de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 2 a 19, en el que dicho antígeno se prepara para la presencia continua en dicho paciente.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: La alimentación oral de LL-OVA reduce significativamente las respuestas de DTH. Se sensibilizaron ratones Balb/c mediante s.c. inyección de OVA/CFA en los días 0 y recibieron una inmunización de refuerzo de OVA/IFA en el día 21. Los ratones se trataron por vía oral con BM9, LLpTREXI, LL-OVA y 1 µg de OVA en los días 7-11, 14-18, 21-25 y 28-31. El día 31, los ratones se inocularon con 10 µg de Ova en 10 µl de solución salina en la aurícula de las orejas. Las respuestas DTH se expresaron como la diferencia en el grosor de la oreja antes y después de la inoculación de OVA para ambas orejas 24 h después de la inoculación.

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

Figura 3: La alimentación oral de LL-OVA reduce significativamente la proliferación específica de OVA de las células T esplénicas CD4<sup>+</sup>. Se sensibilizaron ratones Balb/c mediante s.c. inyección de OVA/CFA en los días 0 y recibieron una inmunización de refuerzo de OVA/IFA en el día 21. Los ratones se trataron por vía oral con BM9 (A), LLpTREXI (B) y LL-OVA (C) en los días 21-25 y 28-31. El día 31, se aislaron esplenocitos en masa y proliferación específica de OVA de células T esplénicas CD4<sup>+</sup> mediante marcado con CFSE y CD4-APC y análisis de citometría de flujo después de 90 horas de reestimulación ex vivo con 100 µg/ml de OVA.

Figura 4: Las células T CD4<sup>+</sup> de los ratones tratados con LL-OVA transfieren tolerancia a los receptores sin previo tratamiento. Se sensibilizaron ratones Balb/c mediante s.c. inyección de OVA/CFA en los días 0 y recibieron una inmunización de refuerzo de OVA/IFA en el día 21. Los ratones se trataron por vía oral con BM9, LLpTREXI y LL-OVA en los días 21-25 y 28-31. El día 31, se aislaron las células T esplénicas CD4<sup>+</sup> y se evaluó la capacidad de transferencia de tolerancia. La transferencia de tolerancia por células T esplénicas CD4<sup>+</sup> de ratones tratados con LL-OVA y LL-pTREX a los receptores sin tratamiento previo se evaluó al sensibilizar e inocular este último para una respuesta DTH, que se expresa como la diferencia en el grosor de la oreja antes y después de la inoculación de OVA para ambos oídos 24 h después de la inoculación.

Figura 5: Se inmunizaron ratones transgénicos NOD AB<sup>o</sup>DQ8 mediante s.c. inyección de 100 µg de eDQ8d en CFA el día 1. Los ratones se trataron por vía oral con LL-eDQ8d o LL-pT1 NX en los días 1-10. Los ratones de control recibieron BM9. En el día 10, los ratones se inocularon con 10 µg de eDQ8d en 10 µl de solución salina en la aurícula de la oreja. Las respuestas DTH se expresan como la media en aumento 24 horas después de la inyección, después de la resta del grosor de la oreja antes de la inoculación de eDQ8d. Los resultados resumen los datos de 3 experimentos independientes, incluidos 6 ratones por grupo.

Figura 6: Después de las mediciones de DTH, se aislaron los bazos (A) y los nódulos linfáticos inguinales (B) de los grupos BM9 (control), LL-pT1NX y LL-eDQ8d y se reinocularon ex vivo con 50 µg de péptido eDQ8d. La respuesta proliferativa específica de eDQ8d de los esplenocitos en masa (p = 0.048) y las células de los ganglios linfáticos inguinales (p = 0.0022) se expresaron como las cpm medias.

Figura 7: Las mediciones de citoquina en el sobrenadante del bazo (A) y las células del nódulo linfático inguinal (B) se realizaron 24 horas después de la reestimulación. Los resultados son promedios de secreción de citoquinas en pg/ml representativos de por lo menos dos experimentos individuales.

Figura 8: Proliferación esplénica disminuida de eDQ8d depende de IL-10 y TGF-β.

## EJEMPLOS

EJEMPLO A: Inducción de tolerancia específica a OVA por *Lactococcus lactis* genéticamente modificada que suministra OVA a ratones de tipo silvestre sensibilizados con OVA

## Introducción

Para este propósito, diseñamos con ingeniería genética OVA que secreta LL (LL-OVA) y evaluamos la inducción de la tolerancia sistémica en un modelo terapéutico para la autoinmunidad/alergia, es decir, el modelo de inmunización OVA.

## Materiales y métodos

5 Bacterias y medios: La cepa *Lactococcus lactis* MG1363 (LL) se modificó genéticamente y se utilizó a lo largo de este estudio. Las bacterias se cultivaron en medio GM17E que consiste en caldo M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 0.5% de glucosa y 5 µg/ml de eritromicina (Abbott). Las suspensiones madre de cepas LL se almacenaron a -20°C en 50% de glicerol en medio GM17E. Las suspensiones madre se diluyeron 500 veces en medio GM17E y se incubaron a 30 °C durante la noche. En 16 h, alcanzaron una densidad de saturación de 2x10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por ml. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en medio BM9 a 2x10<sup>10</sup> bacterias/ml. Cada ratón recibió 100 µl de esta suspensión diariamente a través de un catéter intragástrico.

15 Plásmidos: la secuencia de ARNm que codifica la ovoalbúmina *Gallus gallus* se recuperó de Genbank (número de acceso AY223553) y de los datos publicados. El ARN total se aisló del útero de pollo y el ADNc se sintetizó utilizando 2 µg de ARN total, cebadores oligo dT 2 µM (Promega Corporation Benelux, Leiden, Países Bajos), DTT 0.01 mM (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos), dNTP 0.5 mM (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica), 20 U Rnasin (Promega Incorporation Benelux) y 100 U transcriptasa inversa II superíndice (Invitrogen) en un volumen de 25 µl. Un fragmento de ADNc de OVA se amplificó por reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores: directo 5'-GGCTCCATCGGTGCAGCAAGCATGGAATT-3' (SEQ ID NO: 9) e inverso 5'-ACTAGTTAAGGGGAAACACATCTGCCAAAGAAGAGAA-3' (SEQ ID NO: 10).

25 Las condiciones de reacción fueron de 94 °C durante 2 min seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 62 °C durante 30 segundos y 72 °C por 90 segundos. El fragmento amplificado se fusionó con la señal de secreción de Usp45 del vector pT1 NX resistente a eritromicina, corriente abajo del promotor P1 lactocócico17. Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portan ADNc de OVA se denominaron OVA secretora de *L. lactis* (LL-OVA). La *L. lactis*-pTREXI, que es MG1363 que contiene el vector vacío pTREXI, sirvió como control (LL-pTREX).

Ratones: Se obtuvieron ratones Balb/c hembra de siete semanas de Charles River Laboratories (Calco, Italia) y se alojaron en una instalación animal convencional bajo condiciones libres de patógenos específicos. Los estudios con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Departamento de Investigación Biomédica Molecular de la Universidad de Ghent (archivo no. 07/029).

30 Antígeno: se utilizó proteína V de grado OVA libre de LPS intacta como antígeno en todos los experimentos (Sigma Aldrich).

35 Inmunización de ratones e inducción de tolerancia oral: se inmunizaron ratones Balb/c mediante s.c. inyección de 100 µg de OVA en 100 µl de una mezcla 1:1 de CFA (Difco, BD Bioscience, Erembodegem, Bélgica) y solución salina en la base de la cola el primer día. LL-OVA, LL-pTREX1 o 1 µg de OVA purificada disuelta en 100 µl de BM9 se administraron diariamente los días 7-11, 14-18, 21-25 y 28-31 (régimen 1), y los días 21-25 y 28-31 (régimen 2). Los ratones control recibieron solo BM9. Se introdujeron suspensiones antigénicas o bacterianas en el estómago utilizando una aguja inoxidable de alimentación animal de calibre 18. El día 21, se dio una vacuna de refuerzo por s.c. inyección de 100 µg de OVA en 100 µl de una mezcla 1:1 de IFA (Sigma - Aldrich). La inducción de tolerancia se evaluó mediante respuestas DTH, medición de citoquinas y proliferación específica de OVA, y experimentos de transferencia adoptiva.

40 Respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado: las respuestas de DTH específicas de antígeno se evaluaron mediante inyección de OVA en el día 31. Veinticuatro horas más tarde se realizaron mediciones de DTH. Para la medición de las respuestas de DTH específicas de antígeno, los ratones fueron expuestos a 10 µg de OVA en 10 µl de solución salina en la aurícula de la oreja. El hinchamiento de la oreja, definido como el aumento en el grosor de la oreja debido a la provocación, se midió de forma cegada 24 h después de la inoculación utilizando un micrómetro digital (Conrad, Bélgica). Las respuestas DTH se expresaron como la diferencia en el grosor de la oreja antes y después de la inoculación con OVA para ambos oídos.

45 Ensayos de proliferación específicos de OVA y citoquinas: el día 39, se recogieron los bazoos y se evaluaron los esplenocitos para la proliferación específica de OVA y la producción de citoquinas. Se prepararon suspensiones de células individuales de bazoos AL PASAR las células a través de filtros de células de 70 µm (Becton/Dickinson Labware). Los eritrocitos en las suspensiones celulares se lisaron mediante incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos. Las células T CD4<sup>+</sup> se enriquecieron utilizando el kit de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> y las columnas midiMACS (Miltenyi Biotec, Alemania).

55 Para ensayar la proliferación de poblaciones de esplenocitos totales, se cultivaron 2x10<sup>5</sup> células en placas de fondo en U de 96 pozos en un volumen total de 200 µl de medio completo [es decir, RPMI-1640 que contiene 10% de suero de ternera fetal (FCS), 10 U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomina, L-glutamax2 mM, piruvato de sodio 0.4 mM], ya sea solo o con OVA, agregado en concentraciones que varía de 1.2 a 100 µg/ml. La proliferación se evaluó adicionalmente mediante el marcado 5,6-CFSE (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica). Los esplenocitos se resuspendieron en

5 PBS a  $10^7$ /ml y se incubaron en una concentración final de 10  $\mu$ M de CFSE durante 12 min a 37°C. Las células marcadas se lavaron dos veces con medio completo enfriado con hielo antes de cultivarse a  $2 \times 10^5$  células en placas de fondo en U de 96 pozos en un volumen total de 200  $\mu$ l de medio completo con 100  $\mu$ g/ml de OVA. Después de 90 h de cultivo a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora humidificada, las células se cosecharon y las células se tiñeron con anti-CD4 marcado con alofococianina (BD, Biosciences) y la proliferación se determinó utilizando citometría de flujo (FACSCanto, BD Biosciences).

10 Para ensayar la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>, se cultivaron  $2 \times 10^5$  células CD4<sup>+</sup> células T en placas de 96 pozos en U con esplenocitos cargados con OVA tratada con mitomicina C, que actúan como células presentadoras de antígeno, en proporciones 1/1, 1/0.3, 1/0.1, 1/0.03 y 1/0 en un volumen total de 200  $\mu$ l de medio completo. Las células se cultivaron durante 90 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora humidificada. Para ensayos de proliferación, se añadió 1  $\mu$ l Ci/pozo de [3H] -timidina durante las últimas 18 h de cultivo, el ADN se recolectó en mallas filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE. UU.) Y se midió la radiactividad unida al ADN. en un contador de centelleo (Perkin Elmer). Para las mediciones de citoquinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizados en los diferentes ensayos de proliferación se recogieron después de 72 h de cultivo y se congelaron a -20 °C. La producción de citoquina se cuantificó utilizando el Mouse Flex Set Cytometric Bead Array (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE. UU.).

20 Experimentos de transferencia adoptiva: el día 39, los bazos se recogieron de los grupos de tratamiento. Las suspensiones de células individuales se obtuvieron picando los bazos y haciéndolos pasar a través de filtros de células de 70  $\mu$ m (Becton/Dickinson Labware). Las suspensiones celulares se enriquecieron para las células T CD4<sup>+</sup>, como se describió anteriormente. Las células enriquecidas con CD4<sup>+</sup> se transfirieron adoptivamente a ratones aceptores BALB/c sin tratamiento previo con la inyección i.v de  $1 \times 10^6$  células T CD4<sup>+</sup>. Un día después de la transferencia adoptiva, todos los ratones se sensibilizaron mediante inyección 100  $\mu$ g de OVA/25  $\mu$ l de solución salina/25  $\mu$ l de IFA (Sigma - Aldrich) s. c. en la base de la cola, y 5 días después, los ratones se inocularon de acuerdo el protocolo DTH descrito anteriormente.

25 Análisis estadístico: la importancia de las diferencias entre los grupos en el grosor de la oreja y las mediciones de citoquinas se probaron utilizando ANOVA de una vía. La significancia estadística se indica como\*(p <0.05) o <\*> (p <0.01).

#### Resultados

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

30 Para estudiar la inducción de la tolerancia oral, los ratones fueron alimentados oralmente como se describió anteriormente. La administración de LL-OVA a ratones BALB/c sensibilizados con OVA condujo a una disminución significativa en la respuesta DTH en comparación con los ratones cde ontrol sensibilizados (grupo BM9) y ratones tratados con LL-pTREX1 o 1  $\mu$ g de OVA purificada (Figura 1)

35 Estos datos fueron acompañados por una capacidad proliferativa disminuida significativa y producción de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-6 (Figura 2) de los esplenocitos en masa de los ratones tratados con LL-OVA en comparación con los grupos tratados con BM9 o LL-pTREX1-.

LL-OVA mejora la tolerancia oral a través de las células T CD4<sup>+</sup>.

40 Para evaluar si las células T CD4 median en la inducción de la tolerancia oral, se estudió la respuesta celular T CD4 proliferativa específica de OVA en los esplenocitos. La citometría de flujo demostró que solo el 0.8% de las células T esplénicas CD4<sup>+</sup> proliferan después de la reestimulación de OVA en el grupo LL-OVA en comparación con el 4.5% y el 1.6% en los grupos BM9 y LL-pTREX1 (Figura 3). Adicionalmente, la transferencia adoptiva de células T esplénicas CD4<sup>+</sup> del grupo tratado con LL-OVA a ratones BALB/c sin tratamiento previo demostró que estas células podían transferir tolerancia, ya que estas células podían reducir la respuesta DTH después de inmunizar e inocular a los ratones aceptores con OVA (Figura 4).

#### 45 Conclusión

Aquí, se demuestra que la administración intragástrica de *L. lactis* secretora de OVA suprime las respuestas de células T específicas de OVA mediante la inducción de regulador CD4<sup>+</sup>. Se demuestra que esta inducción de la tolerancia inmune es más potente que la proteína OVA libre, y que esto podría establecerse en un entorno terapéutico.

50 EJEMPLO B: Inducción de tolerancia oral específica s antígeno por Lactococcus lactis modificado genéticamente que suministra epitopos de gliadina inmunodominante específicos de DQ8 a ratones transgénicos de clase II sensibilizados con gluten.

#### Introducción

La enfermedad celíaca, también conocida como celiaquía o enteropatía sensible al gluten, es una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla a partir de una respuesta inmune a granos dietéticos específicos que contienen

gluten. El celiaco es un trastorno multigénico complejo que está fuertemente asociado con los genes que codifican las variantes del antígeno leucocitario humano HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Uno de los aspectos más importantes en la patogénesis de la celiaquía es la activación de una respuesta inmune T-helper 1. Esto surge cuando las células presentadoras de antígeno que expresan moléculas HLA-DQ2/DQ8 presentan los péptidos tóxicos de gluten a las células T CD4 (+). Ambas clases de proteínas del gluten, gliadinas y gluteninas, contienen péptidos que se unen a DQ2 y DQ8. En general, se acepta que la respuesta inmune, como la producción de IFN- $\gamma$  a partir de células T específicas del gluten, desencadena la destrucción de la mucosa en el intestino delgado de pacientes con enfermedad celíaca. Por lo tanto, la activación de una respuesta de células T inmunes perjudiciales en el intestino de pacientes con enfermedad celíaca parece ser clave en el inicio y la progresión de la enfermedad.

La supresión inmune específica de antígeno es un objetivo terapéutico atractivo para el tratamiento de la enfermedad celíaca. El suministro activo de proteínas/péptidos de gluten recombinantes en la mucosa intestinal por *Lactococcus lactis* (LL) modificado genéticamente proporciona un nuevo enfoque terapéutico para la inducción de tolerancia. Para este propósito, se modificó genéticamente el epítipo DQ8 desamidado que secreta LL (LL-eDQ8d) y se evaluó la respuesta inmune local y sistémica en ratones transgénicos NOD AB<sup>0</sup> DQ8 de clase II sensibilizados con gluten de gluten después de la suplementación oral.

Aquí, se demuestra que la administración oral de péptido de gliadina que produce *L. lactis* suprime las respuestas inmunes específicas de gliadina mediante la inducción de células T reguladoras de CD4<sup>+</sup> específicas de antígeno.

#### Materiales y métodos

**Bacterias y medios:** La cepa *Lactococcus lactis* MG1363 (LL) se modificó genéticamente y se utilizó a lo largo de este estudio. Las bacterias se cultivaron en medio GM17E, que es caldo M17 (Disco Laboratories, Detroit, M1) suplementado con 0.5% de glucosa y 5  $\mu$ g/ml de eritromicina (Abbott). Las suspensiones madre de cepas LL se almacenaron a -20°C en 50% de glicerol en medio GM17E. Las suspensiones madre se diluyeron 200 veces en medio GM17E y se incubaron a 30°C durante la noche. Dentro de las 16 h de cultivo, se alcanzó una densidad de saturación de  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por ml. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se concentraron 10 veces en tampón de inoculación BM9 a  $2 \times 10^9$  bacterias/100  $\mu$ l. Para el tratamiento, cada ratón recibió 100  $\mu$ l de esta suspensión diariamente por medio de un catéter intragástrico.

**Plásmidos:** la secuencia que codifica el epítipo DQ8 desamidado (que codifica DQ8d: caa tac cca tca ggt gaa ggt tca ttc caa cca tca caa gaa aac cca caa gct (SEQ ID NO: 1)), se recuperó de los datos publicados. En resumen, dos residuos de glutamina dentro del péptido de alfa-gliadina se cambiaron en ácidos glutámicos para estimular la respuesta de alfa-gliadina inmunodominante desamidada para los pacientes con enfermedad celíaca portadora de DQ8, y este epítipo es reconocido por las células T de estos ratones. El fragmento de ADNc DQ8d se construyó sintéticamente (Operon, Países Bajos) y se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores directos e inversos 5'-caatccatcaggtgaaggttc-3' (SEQ ID N<sup>o</sup>: 11) y 5'-cgactagtaagctgtgggttttctgtgat-3' (SEQ ID NO: 12). Para fines de detección, se unió una e-tag (e) al fragmento, que consta de la siguiente secuencia ggt get cca gtt cca tac cca gat cca ctt gaa cca cgt (SEQ ID NO: 13). Para agregar la e-tag al extremo 5' del gen DQ8d, se utilizó el producto de PCR que se produjo en la etapa 1 (DQ8d) como plantilla en una PCR con los oligonucleótidos 5'-gggtctccagttccataccgatccactgaaccacgtcaataccatca-3' (SEQ ID N<sup>o</sup>: 14) y 5'-cgactagtaagctgtgggttttctgtgat-3' (SEQ ID NO: 15). El fragmento amplificado se fusionó con la señal de secreción de Usp45 del vector pT1 NX resistente a la eritromicina, corriente abajo del promotor P1 lactocócico. Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que llevan ADNc eDQ8d se denominaron *Lactococcus lactis* que secretan eDQ8d (LL-eDQ8d). El LL-pT1 NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío, pT1 NX, sirvió como control.

**Análisis funcional de epítopos secretados:** Para el análisis funcional del epítipo eDQ8d secretado se realizó un ensayo de proliferación con clones de células T humanas derivadas de los intestinos de pacientes con enfermedad celíaca (CD). Las bacterias se cultivaron durante la noche como se describió anteriormente, se diluyeron 1:50 y se cultivaron durante otras 4 o 6 horas respectivamente. Los clones de células T específicos para gluten se generaron a partir de una biopsia de intestino delgado tomada del paciente S, un paciente de CD holandés adulto que había estado en una dieta libre de gluten durante varios años. El paciente dio su consentimiento informado para el estudio, que fue aprobado por el comité de ética del hospital. El paciente fue tipado serológicamente para ser HLA-DR3/4, DQ2/8, llevando así los dos dímeros DQ asociados a CD. Se encontró que el clon de células T II29 respondía a un péptido derivado de alfa-gliadina con un núcleo de 9 aminoácidos mínimo QGSFQPSQQ, cuando se unía a HLA-DQ8. Se descubrió que la desamidación del residuo de glutamina P1 y/o P9 (Q) en ácido glutámico (E) mediante la actividad de la transglutaminasa tisular mejora sustancialmente la capacidad estimuladora de células T de este péptido de gluten. Los ensayos de proliferación se realizaron por duplicado o triplicado en 150  $\mu$ l de medio de cultivo (Iscoves) en placas de fondo plano de 96 pozos (Falcon) utilizando  $10^4$  células T estimuladas con  $10^5$  HLA - DQ emparejadas y 3000 RAD de células mononucleares irradiadas de sangre periférica en ausencia o presencia de sobrenadante a diversas concentraciones. Después de 48 horas, los cultivos se pulsaron con 0.5 uCi de <sup>3</sup>H-timidina, cosechados 18 horas después de la cual se determinó la incorporación de <sup>3</sup>H - timidina como una medida para la proliferación.

**Ratones:** Ratones transgénicos que expresan HLA-DQ8 en un fondo deficiente en MHC11 endógeno (AB<sup>0</sup> DQ8<sup>+</sup>) se retrocruzaron a ratones NOD durante 10 generaciones y se cruzaron para producir ratones congénitos NOD AB<sup>0</sup> DQ8<sup>+</sup>.

Se utilizaron ratones de siete a dieciséis semanas de edad para los experimentos. Los ratones fueron destetados y mantenidos en una instalación convencional para animales hasta las 8-12 semanas de edad.

Antígeno y anticuerpos: epítomos DQ8 desamidados con (GAPVYPDPLEPRQYPSGEGSFQPSQENPQA (SEQ ID NO: 16)) y sin (QYPSGEGSFQPSQENPQA (SEQ ID NO: 2)) se sintetizaron e-tag. Para el fenotipado de células T, los anticuerpos CD4 y CD25 se adquirieron en BD-Biosciences (San Jose, CA), y los kits de tinción APC anti-Foxp3 se adquirieron en eBiosciences (San Diego, EE. UU.), Respectivamente. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 (1 µg/ml, clon JES052A5), anticuerpo monoclonal neutralizante TGF-β (1 µg/ml, clon 1 D11) y anticuerpos neutralizantes LAP (1 µg/ml, clon 27235) de R&D systems (Minneapolis, MN).

Alimentación oral y reacción DTH (hipersensibilidad de tipo retardado): ratones NOD AB<sup>o</sup> DQ8 en un alimento libre de gluten se sensibilizaron mediante inyección subcutánea de 100 µg de péptidos eDQ8 desamidados en 100 µl de solución salina de CFA 1:1. (comprada de Difco of Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA) en la base de la cola el día 1. El péptido utilizado para la sensibilización tenía la misma secuencia que el epítopo secretado. Se alimentó a los ratones con BM9 como control negativo, LL- pT1NX o LL-eDQ8d [todos en los días 1-10 disueltos en 100 µl de BM9]. Las alimentaciones se realizaron mediante administraciones intragástricas de antígeno o suspensiones bacterianas utilizando una aguja de sonda de acero inoxidable 18. Diez días después de la inmunización, se evaluaron las respuestas de DTH específicas de antígeno. Veinticuatro horas después se realizaron mediciones de DTH. Para medir las respuestas de DTH específicas de antígeno, los ratones se inocularon con 10 µg de eDQ8d en 10 µl de solución salina en la aurícula de la oreja. El aumento en el espesor de la oreja se midió de forma ciega utilizando un micrómetro de ingeniero (Mitutoyo, Tokio, Japón) a las 24 h después de la inoculación. Las respuestas de DTH se expresaron como la diferencia de aumento 24 horas después de la inyección de eDQ8d, después de restar el grosor de la oreja antes de la inoculación. Posteriormente se sacrificaron los ratones, se recogieron el bazo y los ganglios linfáticos y se evaluaron las células para determinar la proliferación específica de DQ8d y la producción de citoquinas. Para la interferencia e-tag, se inmunizaron ratones NOD AB<sup>o</sup> DQ8 con 100 µg de péptidos DQ8 desamidados con (eDQ8D) o sin E-tag (DQ8d) en 100 µl de una solución salina 1:1 de adyuvante completo de Freund (CFA, Difco, BD) en la base de la cola en el día 1. El día 7, las mediciones de DTH en el ratón se realizaron como se describió anteriormente con 10 µg de DQ8d con o sin e-tag, que corresponde al péptido utilizado para la inmunización.

Cultivos celulares, proliferación y ensayos de producción de citoquinas: Se prepararon suspensiones celulares de bazo y nódulos linfáticos en el día 11 del experimento al homogenizar el tejido con un triturador de tejidos en 1X PBS. Los eritrocitos se eliminaron de las suspensiones de células de bazo mediante incubación con ACK (cloruro de amonio/potasio (tampón de lisis)). Las células se incubaron en placas de microtitulación de 96 pozos a 5x10<sup>5</sup> células/pozo en volúmenes de 0.2 ml a 37°C en RPMI 1640 (1.5% de HEPES, 1% de Penstrep y 10% de FBS) con suplementos que contienen medio solo, 10 µg de Con A o 50 µg del eDQ8d. En un experimento separado, se agregaron anticuerpos neutralizantes IL-10, TGF-β, IL10 y TGF-β o LAP a esplenocitos de ratones tratados con LL-eDQ8d. Después de 24 h, se evaluó la proliferación mediante la adición de 1 µCi/pozo de [<sup>3</sup>H]-timidina durante las últimas 24 h de cultivo. La radioactividad unida a ADN se cosechó sobre esterillas de filtro de fibra de vidrio y la incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo (Perkin Elmer). Los resultados se expresaron como cpm media de pozos por triplicado. Para las mediciones de citoquinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizados en los diferentes ensayos de proliferación, descritos anteriormente, se recogieron después de 24 h de cultivo y se congelaron a -20 °C hasta que se realizó el análisis de citoquinas. La producción de citoquinas se cuantificó utilizando el Ensayo Mouse Inflammation Cytometric Bead Assay (BD Biosciences).

Análisis de citometría de flujo: se aislaron bazo y tejido de ganglio linfático asociado a intestino (GALT) de ratones tratados con BM9, LL- pT1 NX o LL-eDQ8d, se prepararon como se describió anteriormente y se tiñeron para CD4, CD25 y Foxp3. La tinción intracelular se realizó para Foxp3 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (eBiosciences, San Diego, CA) y posteriormente se midió mediante citometría de flujo en Becton Dickinson FACSCaliburs. Para el análisis, las células se seleccionaron en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> y dentro de estas poblaciones se utilizaron histogramas Foxp3 para determinar la intensidad media de fluorescencia (MFI).

Análisis estadístico: los resultados de las mediciones de citoquinas se expresan como medias ± SEM. Las mediciones de proliferación específica de eDQ8d, espesor de la oreja y citoquina se analizaron para determinar la significación utilizando ANOVA de una vía seguido de la comparación de la prueba t de Student: dos muestras que suponen la misma varianza para determinar las diferencias entre grupos individuales. Para todas las pruebas, se utilizó un valor de p <0.05: \*, <0.01:\*\* para indicar la significación estadística para ambas pruebas.

## Resultados

El suministro en la mucosa de los epítomos de eDQ8d por *L. lactis* disminuye significativamente la respuesta de DTH inducida por DQ8d y la capacidad proliferativa de las células de bazo en masa y los ganglios linfáticos inguinales.

La administración intragástrica diaria de LL-eDQ8d en ratones transgénicos NOD AB<sup>o</sup> DQ8 clase II inmunizados con eDQ8d condujo a una disminución significativa de la respuesta DTH en comparación con los ratones control negativo sensibilizados (Figura 5). Los ratones de control (alimentados con BM9) se inmunizaron claramente a eDQ8d, pero la administración intragástrica diaria de LL-eDQ8d redujo significativamente la DTH (13.1x10<sup>-2</sup> mm frente a 5.1x10<sup>-2</sup> mm, p = 0.0031). La hinchazón de la oreja también se redujo ligeramente en los ratones tratados con LL-pT1 NX en

comparación con los controles ( $9.3 \times 10^2$  mm frente a  $13.1 \times 10^2$  mm  $p = 0.0343$ ) pero en un grado mucho menor que en los ratones LL-eDQ8d tratados. Los ratones DQ8 no transgénicos NOD AB<sup>g</sup> mostraron solo un aumento menor en el espesor de la oreja ( $3.2 \times 10^2$  mm). Estos datos indican que el LL-eDQ8d administrado por vía oral suprime las respuestas de células T inflamatorias y sistémicas en ratones transgénicos inmunizados con NOD AB<sup>g</sup> DQ8 y que el antígeno secretado es necesario para la inducción de un efecto tolerogénico significativo.

Estos datos fueron acompañados por una capacidad proliferativa disminuida significativa de los esplenocitos y las células del nódulo linfático inguinal (Figura 6). La respuesta proliferativa reducida estuvo acompañada por una regulación positiva significativa de IL-10 y una regulación a la baja de la producción de IL-12 después de la estimulación eDQ8d ex vivo de esplenocitos (Figura 7). Más aún, LL-eDQ8d redujo significativamente la producción de IFN- $\gamma$  inducida por eDQ8d en los ganglios linfáticos inguinales en comparación con los ratones tratados con BM9 y LL-pT1 NX. En conjunto, estos datos indican que el tratamiento LL-eDQ8d suprime la activación de las células T después de la estimulación eDQ8d y sugieren que la activación de DC también puede ser modulada.

Disminución de proliferación específica de eDQ8d esplénico depende de IL-10 y TGF- $\beta$ , y el tratamiento con LL-DQ8d aumenta significativamente la expresión de Foxp3 esplénica y GALT.

La importancia funcional de TGF- $\beta$ , IL-10, y LAP (TGF- $\beta$  asociado a la membrana) en la respuesta proliferativa esplénica específica de eDQ8d se analizó utilizando anticuerpos neutralizantes. IL-10-, TGF- $\beta$  o anticuerpos neutralizantes de LAP no interfirieron significativamente con la disminución de la respuesta proliferativa esplénica de los ratones tratados con LL-eDQ8d, pero agregaron una combinación de anticuerpos monoclonales neutralizantes de TGF- $\beta$  e IL-10 que abolieron por completo la capacidad proliferativa específica de eDQ8d reducida de esplenocitos de ratones tratados con LL-eDQ8d (figura 8). Estos datos sugieren fuertemente que el tratamiento con LL-eDQ8d es capaz de suprimir la activación de células T en ratones transgénicos de clase II NOD AB<sup>g</sup> DQ8 inmunizados con DQ8d y que esta supresión depende tanto de IL-10 como de TGF- $\beta$ . Adicionalmente, se observó una regulación al alza significativa de Foxp3 dentro de la CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> esplénica así como de la población de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de los ratones tratados con LL-eDQ8d en comparación con el control (BM9) (IMF 171 vs 61 y 35 vs 6, respectivamente). Sorprendentemente, Foxp3 también fue regulado positivamente en la población CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en el tejido del ganglio linfático asociado al intestino (GALT) de los ratones tratados con LL-eDQ8d en comparación con los tratados con BM9 (MFI 73 frente a 30), pero no en la población GALT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. La alimentación con LL-pT1 NX también indujo algo de regulación al alza de Foxp3, pero exclusivamente en la población de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> esplénicas y en menor medida que LL-eDQ8d (MFI 15 vs 35, respectivamente).

## 30 Conclusión

Nuestros datos demostraron que el suministro por vía mucosa de un péptido inmunodominante derivado de gliadina para respuestas de células T mediadas por DQ8 – mediante *L. lactis* modificado genéticamente, induce la supresión de respuestas de células T restringidas DQ8 locales y sistémicas en ratones transgénicos NOD AB<sup>g</sup> DQ8 clase II. El tratamiento dio como resultado una disminución específica del antígeno de la capacidad proliferativa de los esplenocitos y las células del nódulo linfático inguinal, que era críticamente dependiente de la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  y se asoció con una inducción significativa de linfocitos T reguladores de Foxp3<sup>+</sup>. Debido a que este enfoque de las bacterias que suministran antígenos tiene la capacidad de potenciar la tolerancia oral incluso en el contexto de una hipersensibilidad establecida, puede ser aplicable para el tratamiento de la enfermedad celíaca y posiblemente otras enfermedades autoinmunes y/o alérgicas.

## 40 Epítipo DQ8 nativo

Los experimentos anteriores se repiten con el epítipo de  $\alpha$ -gliadina nativa, es decir. QYPSGQGSFQPSQQNPQA (SEQ ID NO: 4), que corresponde a los residuos 203-220 de la secuencia que se puede recuperar a través de la entrada Q9M4L6 de UniProtKB/TrEMBL. Dicho epítipo DQ8 nativo se codifica por la secuencia de nucleótidos 5'-caa tac cca tea ggt caa ggt té ttc caa cca tea caa caa aac cca caa gct-3' (SEQ ID NO: 3).

Los resultados con el epítipo de  $\alpha$ -gliadina DQ8 nativa son esencialmente idénticos a los resultados descritos anteriormente para el epítipo de  $\alpha$ -gliadina DQ8 desamidado.

## Ensayo en pacientes celíacos que utilizan epítipo DQ8

En un estudio preliminar, *L. lactis* diseñado por ingeniería de acuerdo con la invención se utiliza como un agente terapéutico en un ensayo en pacientes con enfermedad celíaca. Nuestros hallazgos prometen que este enfoque es efectivo de una manera específica de antígeno.

La enfermedad celíaca es un objetivo especialmente atractivo para este enfoque, debido a la capacidad de la LL para suministrar el antígeno en el sitio de la respuesta primaria para lograr tolerancia tanto directa como de activación inespecífica

## Ensayo en pacientes celíacos que utilizan epítipo DQ2

No existen ratones transgénicos que expresen HLA-DQ2 en un antecedente endógeno de MHC II deficiente, comparable a los ratones HLA-DQ8 como se utilizó anteriormente. De acuerdo con lo anterior, los experimentos descritos anteriormente para epítomos DQ8 no fueron posibles en un modelo de ratón apropiado. Por lo tanto, llevamos a cabo algunos experimentos preliminares en pacientes con enfermedad celíaca, utilizando epítomos DQ2 de  $\alpha$ -gliadina tanto nativos como desamidados.

Específicamente, los experimentos anteriores se repiten utilizando:

epítomo DQ2 desamidado LQLQPFQPELPYPQQLPYPQPELPYPQPQPF (SEQ ID N°: 6), codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-tta caa tta caa cca ttc cca caa cca gaa tta cca tac cca tta cca tac cca caa cca gaa tta cca tac cca caa cca ttc (SEQ ID NO: 5)

y el epítomo DQ2 nativo: LQLQPFQQLPYPQQLPYPQQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 8), codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-tta caa tta caa cca ttc cca caa cca caa tta cca tac cca tta cca tac cca caa cca caa tta cca tac cca caa cca ttc (SEQ ID NO: 7)

Los resultados con el epítomo DQ2 de  $\alpha$ -gliadina nativa y desamidado son esencialmente idénticos a los resultados descritos anteriormente para los epítomos DQ8 de  $\alpha$ -gliadina.

EJEMPLO C: Inducción de tolerancia al factor VIII y factor IX de coagulación después de la administración oral de *L. lactis* que secreta dichos factores

#### Introducción

Diversas proteínas terapéuticas (recombinantes), tales como interferón, factor VIII/IX y anticuerpos (Remicade) se administran en dosis altas durante periodos de tratamiento prolongados. Sin embargo, una complicación asociada con su uso es el desarrollo de respuestas inmunes específicas de proteínas, tales como los anticuerpos. Estos anticuerpos (Abs), también llamados inhibidores, hacen que las proteínas terapéuticas sean menos efectivas. Los ejemplos incluyen la formación de inhibidores para factor VIII/IX en hemofilia, eritropoyetina (Epo) en pacientes sometidos a terapia para insuficiencia renal crónica e IFN- $\alpha$  en pacientes sometidos a tratamiento para esclerosis múltiple. Aquí, se demuestra que el suministro oral del Factor VIII (y Factor IX) por *L. lactis* suprime la formación inhibitoria a dicho factor mediante la inducción de células T reguladoras de CD4<sup>+</sup> específicas de antígeno.

#### Material y métodos

Bacterias y plásmidos: la cepa MG1363 de *L. lactis* se utiliza a lo largo de este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM17, es decir M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 0.5% de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se almacenan a -20°C en 50% de glicerol en GM17. Para las inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 200 veces en GM17 fresco y se incuban a 30 °C. Alcanzan una densidad de saturación de  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por ml dentro de las 16 horas. A lo largo de este estudio, se utilizan suspensiones bacterianas mixtas. Por lo tanto, las bacterias que se mezclan se recogen por centrifugación y los sedimentos de ambos cultivos bacterianos se concentran 10 veces en medio BM9 (Schotte, Steidler et al., 2000). Para el tratamiento, cada ratón recibe 100  $\mu$ l de esta suspensión mediante un catéter intragástrico.

Los fragmentos de ADNc o ADNc de FVIII y FIX humano, que representan epítomos de células T CD4<sup>+</sup> específicas a FVIII y FIX, se amplifican fusionados a la señal de secreción de Usp45 del vector pT1 NX resistente a eritromicina, corriente abajo del promotor P1 de lactococos.

Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que llevan FVIII humano (y/o fragmento de epítomo), FIX (y/o fragmento de epítomo), se denominaron *L. lactis* que secreta LL-FVIII, LL-FIX. LL- pT1 NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1 NX, sirve como control.

La cuantificación de FVIII y FIX: FVIII o FIX de LL-FVIII y LL-FIX, respectivamente, se determina utilizando el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) específico a FIX y FVIII humano que se han descrito previamente (Chuah et al., 2003). Las proteínas recombinantes también se analizan mediante análisis de transferencia Western y ensayos COATests y aPTT, tal como se describe (Chuah et al., 2003; VandenDriessche et al., 1999). El extremo NH2 de esta proteína se determina por degradación automatizada de Edman. Debido a que FVIII y FIX normalmente se expresan en el hígado donde se someten a modificaciones postraduccionales extensas, los factores de coagulación producidos a partir de *L. lactis* diseñado por ingeniería pueden ser biológicamente inactivos. Sin embargo, estas diferencias postraduccionales probablemente no tendrán repercusiones sobre la capacidad de estas proteínas recombinantes producidas por *L. lactis* para inducir tolerancia inmune. De hecho, la mayoría de los inhibidores que se han caracterizado en detalle hasta la fecha normalmente reconocen residuos de aminoácidos (Villard et al., 2003), en lugar de fracciones glucosiladas.

Animales: Los ratones con hemofilia A o B obtenidos por desactivación de los genes murinos FVIII o FIX utilizando recombinación homóloga en células ES como se describe por (Bi y col., (1995) y Wang et al., (1997), se crían en el laboratorio. Estos ratones receptores generan anticuerpos neutralizantes cuando se estimulan con el antígeno FVIII o

FIX recombinante purificado en presencia de CFA (Mingozzi et al., 2003). El estado del inhibidor se puede monitorizar a lo largo del tiempo utilizando ensayos Bethesda o ELISA específicos anti-FVIII/anti-FIX. Los ratones receptores inoculados con FVIII o FIX (+ CFA) normalmente desarrollan inhibidores 2-3 semanas después de la inoculación antigénica.

5 Configuración experimental: los ratones de 4 a 6 semanas reciben FVIII, FIX, LL-FVIII, LL-FIX o LL-pT1 NX o LL-OVA (un antígeno irrelevante) (1 o 10 µg). Como un control positivo para la inducción de tolerancia, inyectamos ratones con vectores virales adenoasociados (AAV) que expresan FIX a partir de un promotor específico de hepatocitos. Los animales receptores desarrollan tolerancia inmune específica para FIX que previene la inducción de anticuerpos anti-FIX en la inoculación posterior con FIX + CFA.

10 En un entorno profiláctico, FVIII, FIX, LL-FVIII, LL-FIX solo se administran por vía oral a ratones A o B cobn hemofilia utilizando un catéter gástrico, utilizando diferentes intervalos de tratamiento y dosis. Estos ratones receptores se inoculan posteriormente con antígeno FVIII o FIX recombinante purificado, en presencia de CFA (Mingozzi et al., 2003). Los animales de control se exponen a LL- pT1 NX y LL-OVA. El plasma se cosecha mediante hemorragia retroorbital. El desarrollo de anticuerpos dirigidos contra FVIII o FIX se evalúa utilizando ensayos Bethesda (Kasper et al., 1975) o utilizando un ELISA específico anti-FVIII o anti-FIX modificado (VandenDriessche et al., 1999) a diferentes intervalos de tiempo.

En un entorno terapéutico, los ratones hemofílicos A o B se inmunizan primero con FVIII o FIX, como se describe (Mingozzi et al., 2003). El estado del inhibidor se monitoriza a lo largo del tiempo utilizando ensayos Bethesda o ELISA específicos anti-FVII 1/anti-FIX. Los ratones con títulos de inhibidor bajos o altos se tratan posteriormente con FVIII, FIX, LL-FVIII, LL-FIX solos utilizando diferentes intervalos de tratamiento y las dosis y títulos de inhibidor se determinan a lo largo del tiempo. La especificidad de la posible tolerancia inmune se evalúa al inocular los ratones que reciben FVIII, FIX, LL-FVIII, LL-FIX solo con un antígeno irrelevante (toxoides tetánico u Ova).

20 Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citoquinas: Se preparan suspensiones de células individuales de bazo y nódulos linfáticos al pasare las células a través de filtros de células de 70 µm (Becton/Dickinson Labware). Los eritrocitos se eliminan de las suspensiones de células de bazo por incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos.

Ensayos de proliferación de poblaciones totales de esplenocitos, se cultivan  $2 \times 10^5$  células en placas con fondo en U de 96 pozos en un volumen total de 200 µl de medio completo solo o con FVIII o FIX purificado, y con o sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF-β. Se agregan FVIII y FIX a concentraciones que varían de 1 a 100 µg/ml. Los anticuerpos neutralizantes se agregan a 1, 0.1 y 0.01 µg/ml. Para ensayos de proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y poblaciones de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>,  $0.2 \times 10^5$  células T CD4<sup>+</sup> o células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> se cultivan en placas de 96 pozos con fondo en U con  $1 \times 10^5$  células CD4<sup>+</sup> irradiadas, que actúan como células presentadoras de antígeno, y FVIII o FIX (0 o 100 µg/ml) en un volumen total de 200 µl de medio completo con o sin anticuerpos neutralizantes. Después de 72 a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%, la proliferación se evalúa mediante la adición de 1 µCi/pozo de [<sup>3</sup>H]-timidina. La radioactividad unida a ADN se cosecha 16-18 horas después en esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

Para las mediciones de citoquinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizados en los diferentes ensayos de proliferación se recogen después de 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelan a -20 °C hasta que se realiza el análisis de citoquinas. La producción de citoquinas se cuantifica utilizando el Ensayo de Perlas Citométricas de Inflamación en Ratones (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE. UU.).

Ensayo de actividad reguladora T in vivo: con el fin de probar la supresión activa de la formación de anticuerpos en ratones, esplenocitos, células CD4<sup>+</sup> purificadas en perlas, células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> aisladas de los diferentes grupos experimentales tratados con *L. lactis* se transfieren adoptivamente a ratones C3H/HeJ sin tratamiento previo. Los ratones no tratados se utilizan como control. El número de células transferidas es  $10^7$  para células de bazo enteras, células de bazo reducidas en subpoblación o células CD4<sup>+</sup> seleccionadas positivamente y células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Los ratones receptores (n = 4-5 por cohorte experimental) se inyectaron por vía subcutánea con 5 µg de hF.IX en cFA 36 horas después de la transferencia adoptiva. Los títulos de IgG anti-hF.IX en plasma se midieron 2,5 semanas después de la inmunización.

#### Resultados

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

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

55 LL-FIIIV y LL-FIX potencian la tolerancia oral en asociación con títulos reducidos de FVIII y FIX y IFN-γ y más producción de IL10 y TGF-β en respuesta a dicho factor.

5 Para estudiar la inducción de la tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se describió anteriormente (configuración experimental). Los anticuerpos específicos de FVIII y FIX y la producción de citoquinas en respuesta a dicho factor en esplenocitos y nódulos linfáticos se cuantifican como se describió anteriormente. La formación y producción de inhibidor de la citoquina proinflamatoria, IFN- $\gamma$  se reduce fuertemente y las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- $\beta$  se incrementan significativamente en el grupo LL-FVIII/FIX en comparación con el control y grupos FVIII /IX libres.

LL-FVIII/FIX mejora la tolerancia oral a través de las células T CD4<sup>+</sup>

10 Para evaluar si las células T CD4<sup>+</sup> median la inducción de la tolerancia oral, se estudia la respuesta de células T CD4<sup>+</sup> proliferativa específica a factor en los esplenocitos y los ganglios linfáticos. Por lo tanto, los ratones se alimentan oralmente como se describió anteriormente (configuración experimental) y la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> específicas del factor se determina como se describe en cultivos celulares, proliferación y ensayo de citoquinas. La respuesta de células T CD4<sup>+</sup> específicas a factor en el grupo LL-FVIII/FIX se reduce significativamente en comparación con el control y los grupos FVIII/IX libres.

15 Las células reguladoras T inducidas por antígeno después de terapia LL-FVIII/FIX pueden transferir la protección de la formación de inhibidor in vivo

20 Con el fin de probar la supresión activa de la formación de anticuerpos en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, transferimos adoptivamente esplenocitos de los diferentes grupos tratados como se describió anteriormente (ensayo de actividad reguladora T in vivo). En comparación con los controles y los grupos FVIII/IX libres, la formación de IgG anti-factor se reduce significativamente en el grupo LL - FVIII/FIX, lo que indica la activación de las células T CD4<sup>+</sup> reguladoras en nuestro protocolo combinado de tolerancia oral.

#### Conclusión

Nuestros datos demuestran que el suministro a la mucosa de *L. lactis* recombinante que secreta FVIII o FIX es más potente que FVIII o FIX libre en la supresión de la formación de inhibidores específicos de FVIII y FIX en ratones con hemofilia A y B, respectivamente.

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

#### Introducción

30 El asma alérgica es un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias. Se caracteriza por obstrucción reversible de la vía aérea, niveles séricos elevados de inmunoglobulina E específica a alérgeno, hipersecreción de moco e hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) a estímulos ronchospasmogénicos. Sus síntomas empeoran por la exposición a un alérgeno (por ejemplo, polen de árboles, hierba y hierba, polvo y ácaros del polvo, moho, caspa de animales) al que el paciente ha sido sensibilizado. Los linfocitos T-ayudador (Th2) de tipo 2 desempeñan una función crucial en el inicio, la progresión y la persistencia de la enfermedad. Los datos actuales sugieren que las respuestas Th2 a alérgenos normalmente son suprimidas por las células T reguladoras. Adicionalmente, la supresión de este subconjunto disminuye en individuos alérgicos. Aquí, se demuestra que la administración oral de alérgeno por *L. lactis* suprime las respuestas similares al asma mediante la inducción de células T reguladoras de CD4<sup>+</sup> específicas de antígeno.

#### Material y métodos

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

El modelo alérgeno Ova: los ratones sensibilizados con OVA se inoculan por inhalación con aerosol de OVA que conduce a inflamación eosinofílica dependiente de citoquinas Th2, hiperreactividad bronquial y producción de IgE, hallazgos altamente característicos del asma alérgica humana (Brusselle, 1994, Clin Exp Allergy 24:73; Kips et al. 1996, Am J Respir Crit Care Med 153:535; Brusselle et al. 1995, Am J Respir Cell Mol Biol 12:254).

45 Bacterias: La cepa MG1363 de *L. lactis* se utiliza a lo largo de este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM17, es decir M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 0.5% de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se almacenan a -20°C en 50% de glicerol en GM 17. Para las inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 500 veces en GM17 fresco y se incuban a 30 °C. Alcanzan una densidad de saturación de 2 x 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por mL. dentro de las 16 horas. Las bacterias se recolectan por centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100  $\mu$ L de esta suspensión diariamente mediante un catéter intragástrico.

50 Plásmidos: la secuencia de ARNm que codifica la ovoalbúmina Gallus gallus se obtiene de Genbank (número de acceso AY223553). El ARN total se aísla del útero de pollo y el ADNc se sintetiza utilizando 2  $\mu$ g de ARN total, cebadores oligo dT 2  $\mu$ M (Promega Corporation Benelux, Leiden, Países Bajos), DTT 0.01 mM (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The

Holanda), dNTP 0.5 mM (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica), 20 U Rnasin (Promega Incorporation Benelux) y 100 U superíndice transcriptasa II (Invitrogen) en un volumen de 25 µl. El fragmento de ADNc de OVA se amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 min seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 62 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 90 segundos, con los siguientes cebadores directos e inversos 5'-GGCTCCATCGGTGCAGCAAGCATGGAATT-3' (SEQ ID NO: 17) y 5'-ACTAGTTAAGGGGAAAC-ACATCTGCCAAAGAAGAGAA-3' (SEQ ID NO: 18).

El fragmento amplificado se fusiona con la señal de secreción de Usp45 del vector pT1 NX resistente a la eritromicina, corriente abajo del promotor P1 lactocócico.

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

Cuantificación de OVA: OVA de LL-OVA se determinan utilizando un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) específico de OVA desarrollado en casa. La producción de las proteínas recombinantes también se evalúa por análisis de transferencia Western.

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

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

Inducción de tolerancia oral: los ratones reciben LL-OVA, LL-pTREX1, 1 µg de OVA o BM9 los días 0-4, 7-11, 14-18 y 21-25. Como control positivo para la inducción de tolerancia oral, los ratones son alimentados con 30 mg de OVA mediante catéter intragástrico que reduce la eosinofilia bronquial y la hiperreactividad de las vías respiratorias, siendo la de alimentación a dosis alta más efectiva que la alimentación a dosis baja.

Medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR): 24 h después de la inhalación final (día 50), la hiperreactividad de las vías respiratorias se evalúa mediante la obstrucción del flujo de aire inducida por metacolina. Los ratones se exponen durante 2.5 minutos a solución salina fisiológica nebulizada (Otsuka Pharmaceutical), seguido de dosis incrementales (1-30 mg/ml) de metacolina nebulizada. Estos ratones se colocan en un pletismógrafo de cuerpo completo durante 2.5 minutos después de la nebulización, y se mide la pausa mejorada (Penh) utilizando el sistema Biosystem XA WBP (Buxco Electronics). "Penh" representa la obstrucción pulmonar del flujo de aire y se calcula utilizando la fórmula:  $Penh = ((Te - Tr)/(Tr \times PEF/PIF))$ , en la que Penh = pausa mejorada (sin dimensiones), Te = tiempo espiratorio (segundos), Tr = tiempo de relajación (segundos), PEF = flujo espiratorio máximo (mililitros por segundo) y PIF = flujo inspiratorio máximo (mililitros por segundo). Penh se mide y promedia aproximadamente cada 5 s, y los valores acumulados se promedian como el valor de Penh para cada punto de tiempo. La hiperreactividad de las vías respiratorias se expresa como PC200Mch (200% de concentración provocadora de metacolina), que es la concentración de metacolina que duplica el valor de Penh de referencia.

Análisis del fluido de lavado broncoalveolar (BALF): después de la medición de la hiperreactividad de las vías respiratorias, se obtienen muestras de lavado broncoalveolar. Los ratones son sacrificados por inyección i.p. de sobredosis de ketamina y xilazina, y luego se lavan los pulmones con 0.5 ml de solución salina cuatro veces. El fluido de lavado se centrifuga y las células se resuspenden en 1 ml de solución salina con 1% de BSA. El número total de células se cuenta utilizando un hemocitómetro. Las muestras de Cytospin se preparan al centrifugar las suspensiones a 300 rpm durante 5 min. Para distinguir claramente los eosinófilos de los neutrófilos, se aplican tres tinciones diferentes: tinciones Diff-Quick, May-Gr [upsilon] nwald-Giemsa y Hansel (eosina). Por lo menos 300 leucocitos se diferencian mediante microscopía de luz con base en los criterios morfológicos estándar. El nivel de IL-13, IL-4 e IL-5 en BALF se detecta mediante el ensayo de cuentas citométricas (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE. UU.) Siguiendo las instrucciones del fabricante.

Medición de IgE total sérica y Ig específica de OVA: el día 50, se obtienen muestras de sangre del seno retroorbital bajo anestesia. Una vez que las muestras se coagularon por completo, se centrifugaron y los sueros se recogieron y almacenaron a -80°C hasta su uso. La IgE total se ensaya mediante ELISA utilizando Abs emparejados (BD Pharmingen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para medir IgE específica de OVA, IgG1 e IgG2a en sueros, se recubren placas de microtitulación (Maxisorp, Nunc, VWR International, Haasrode, Bélgica) con 2 µg/ml de OVA. Posteriormente, los pozos se bloquean con 0.1% de caseína en PBS, después de lo cual las placas se incuban con muestras de suero de ratón diluidas 1:10 a 1:20480 en PBS que contiene 0.1% de caseína y 0.05% de Tween 20 (PBS-CT), con IgG2a-HRP anti-ratón de cabra [Southern Biotechnology Associates (SBA), Imtec ITK Diagnostics, Antwerpen, Bélgica, dilución 1:5000], IgG1-HRP anti-ratón de cabra o IgE-HRP anti-ratón de cabra (SBA, dilución 1:5000). Después del lavado, se agrega reactivo del sustrato [3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), Pharmingen, Becton Dickinson, Erembodegem, Bélgica] a cada pozo. Finalmente, las reacciones se detienen al agregar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M a los

pozos. Las absorbancias se leen a 450 nm. Los puntajes de ELISA se expresan como títulos, que son los inversos de la dilución más alta que todavía tenía en OD<sub>450</sub> mayor que el valor de corte calculado. El punto de corte se calcula a medida que la OD<sub>450</sub> media de 5 ratones no inmunizados aumenta con tres veces la SD.

5 Examen histológico del tejido pulmonar: después de obtener muestras de lavado broncoalveolar, los pulmones se perfunden con solución salina fisiológica y se resectan de los ratones. Los pulmones se fijan con formalina tamponada neutralizada y se embeben en parafina. Las secciones (3-µm de espesor) se tiñen con H&E o ácido periódico - Schiff (PAS). La intensidad de los cambios histológicos en los pulmones se evalúa con cuatro puntuaciones de calificación (0, sin inflamación, 1, leve/leve, 2, moderada y 3, grave), de acuerdo con la distribución y la intensidad de los siguientes hallazgos: 1) desprendimiento u ondulación epitelial de los núcleos de las células epiteliales bronquiales, 2) aumento en el número de células calciformes, 3) infiltración de células inflamatorias de los vasos en el área mucosa y submucosa del bronquio e intersticio peribronquial, y 4) hipertrofia y engrosamiento de la capa de células de músculo liso.

10 RT-PCR para el análisis de la expresión génica de citoquinas y quimiocinas en el pulmón: los pulmones se extraen después de perfusión con solución salina fisiológica, y el ARN total se extrae utilizando ISOGEN (Nippon Gene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total (10 µg) se transcribe de forma inversa utilizando el cebador oligo (dT) 15 (Promega) y la transcriptasa inversa Superscript II RNase H (Invitrogen Life Technologies) a 42 °C por 2 h. Para garantizar que cada muestra contenga la misma cantidad de ADNc, la concentración de ADNc de la β-actina de cada muestra se determina primero utilizando cebadores específicos de β-actina. Estas muestras se amplifican durante el número apropiado de ciclos, de tal manera que la cantidad de producto de PCR permaneció en la parte lineal de la curva de amplificación. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los niveles de IL-13, eotaxina, IL-10, IFN-γ y TGF-β se determinan utilizando los siguientes conjuntos de cebadores específicos.

15 El cebador con sentido para β-actina 5'-ACGACATGGAGAAGATCTGG-3' (SEQ ID NO: 19), y el cebador antisentido 5'-TCGTAGATGGGCACAGTGTG- 3' (SEQ ID NO: 20).

20 El cebador con sentido para IL-13 5'-TCTTGCTTGCCTTGGTGGTCTCGC-3' (SEQ ID NO: 21), y el antisentido 5'-GATGGCATTGCAATTGGAGATGTTG- 3' (SEQ ID NO: 22).

25 El cebador con sentido para eotaxina 5'-GGGCAGTAACCTCCATCTGTCTCC-3' (SEQ ID NO: 23), y el cebador antisentido 5'-CACTTCTTCTGGGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 24).

30 El cebador con sentido para IL-10 5'-TACCTGGTAGGAGTGATGCC-3' (SEQ ID NO: 25), y el antisentido 5'-GCATAGAAGCATACATGATG- 3' (SEQ ID NO: 26).

35 El cebador con sentido para IFN-γ 5'-CATAGATGTGGAAGAAAAGA-3' (SEQ ID NO: 27), y el antisentido 5'-TTGCTGAAGAAGGTAGTAAT- 3' (SEQ ID NO: 28).

40 El cebador con sentido para TGF-β 5'-CTTTAGGAAGGACCTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 29), y el antisentido 5'-CAGGAGCGCACAATCATGTT- 3' (SEQ ID NO: 30).

45 Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citoquinas: Un día después de la inhalación final (día 50) se preparan suspensiones de células individuales de bazo y ganglios linfáticos mediastinales al pasar las células a través de filtros de células de 70 µm (Becton/Dickinson Labware). Los eritrocitos se eliminan de las suspensiones de células de bazo mediante incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos. Las células T CD4<sup>+</sup> y las células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> se enriquecen utilizando el kit de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Alemania) o el kit de aislamiento de células T regulador CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).

50 Ensayos de proliferación de poblaciones de esplenocitos y LN en masa, se cultivan 2 x 10<sup>5</sup> células en placas de 96 pozos con fondo en U en un volumen total de 200 µl de medio completo solo o con OVA purificada. Se agrega OVA a concentraciones que varían de 1 a 100 µg/ml. Para ensayos de proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>-, se cultivan 2 x 10<sup>5</sup> células T CD4<sup>+</sup> o células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en placas en forma de U de 96 pozos con esplenocitos tratados con mitomicina que están cargadas con 1 mg/ml de OVA durante 16 h, que actúan como células presentadoras de antígeno, en la célula T CD4<sup>+</sup> de relación o en la célula T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>/APC 1/1, 1/0.3, 1/0.1, 1/0.03, 1/0 en un volumen total de 200 µl de medio completo. Después de 72 h a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%, la proliferación se evalúa mediante la adición de 1 µCi/pozo de [<sup>3</sup>H]-timidina. La radioactividad unida a ADN se cosecha 18 h más tarde en placas de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

55 Para las mediciones de citoquinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizados en los diferentes ensayos de proliferación se recogieron después de 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelaron a -80 °C hasta que se realiza el análisis de citoquinas. La producción de citoquinas se cuantifica utilizando la matriz de perlas citométricas de inflamación de ratón (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE. UU.).

Ensayo de actividad reguladora T in vivo: Un día después de la inhalación final (día 21), los bazos de los ratones tratados se digieren con colagenasa al 0.1% (Sigma-Aldrich) a 37°C por 20 min. En algunos experimentos, se preparan

suspensiones de células individuales de células de bazo enteras y se cultivan con Con A (2 µg/ml; Sigma - Aldrich) durante 48 h. Las células se recogen y  $10^7$  células se transfieren adoptivamente i.v. en ratones BALB/c sin tratamiento previo. Para la selección negativa, las células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> o CDHb<sup>+</sup> se agotan a partir de células de bazo completas utilizando perlas magnéticas (MACS; Miltenyi Biotec) con mAb CD4, CD8, CD11c, CD19 y CD11b anti-ratón biotilato (BD Pharmingen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La eficiencia del agotamiento se examina mediante citometría de flujo (> 99%). Las células CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se purifican utilizando el kit de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup>. Kit de aislamiento de células T reguladoras siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las células seleccionadas positivamente se verifica utilizando citometría de flujo. Para experimentos de transferencia de células, las células se transfieren a ratones BALB/c desde las venas de la cola justo antes de su primera inmunización o justo después de su segunda inmunización con OVA/alumbre. El número de células transferidas es de  $10^7$  para células de bazo enteras, células de bazo reducidas en subpoblación o células CD4<sup>+</sup> seleccionadas positivamente y células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>.

En el modelo SCID humanizado (hu-SCID) (descrito por Duez et al., 2000; Hammad et al., 2000).

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

#### Bacteria

La cepa MG1363 de *L. lactis* se utiliza a lo largo de este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM 17, es decir M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 0.5% de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se almacenan a -20°C en 50% de glicerol en GM17. Para las inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 200 veces en GM 17 fresco y se incuban a 30 °C. Alcanzaron una densidad de saturación de  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por mL dentro de las 16 horas. Las bacterias se recolectan por centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 µL de esta suspensión diariamente mediante un catéter intragástrico.

#### Plásmidos

Der p 1, una glicoproteína globular de 222 residuos de aminoácidos, es uno de los alérgenos principales de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt). La secuencia de ADN con el uso óptimo del codón de *L. lactis* que codifica la proteína Der p 1 se sintetiza, amplifica y fusiona a la señal de secreción de Usp45 del vector pT1 NX resistente a la eritromicina corriente abajo del promotor P1 de lactococos. Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que portan ADNc de Der p 1 murino, Der p 1 aa52-71 y Der p 1 aa117-133 se denominan LL-Derp1, LL-Derp1aa52-71 y LL-Derp1aa117-133. LL-pT1NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1 NX, que sirve como control.

#### Cuantificación de Der p 1

Der p 1 de LL-Derp1 se determina utilizando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) específico a Der p 1 desarrollado internamente. La producción de las proteínas recombinantes también se evalúa por análisis de transferencia Western.

#### Pacientes

La sangre se recoge de donantes sensibles o no sensibles a los ácaros del polvo doméstico. Los pacientes alérgicos presentan las características habituales de sensibilización a los ácaros del polvo doméstico. Las pruebas de punción cutánea hacia alérgeno de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (Stallergenes, Fresnes, Francia) (diámetro ≥ 10 mm) son positivas, y todos los pacientes tienen anticuerpos IgE séricos específicos. Las concentraciones totales de IgE son superiores a 150 IU/ml (150-1600 l/ml). Los donantes sanos se prueban como controles negativos (los niveles totales de IgE son inferiores a 150 IU/ml, y tienen pruebas cutáneas negativas para los alérgenos comúnmente inhalados).

#### Preparación de células mononucleares de sangre periférica humana

Se obtiene plasma rico en plaquetas después de la centrifugación (120 x g, 15 minutos) y se descarta. Luego, las células sanguíneas se diluyen en RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, Escocia) (volumen/volumen) y se colocan en capas sobre un gradiente de Ficoll (Farmacia, Uppsala, Suecia). Después de centrifugación (400 x g, 30 minutos), las PBMC se recogen en la interfaz y se lavan tres veces en medio RPMI estéril antes de la transferencia.

#### Ratones

Se mantienen ratones SCID C.B.-17 (6-8 semanas de edad) en aisladores con lecho esterilizado en una instalación animal específica. La colonia de SCID se verifica regularmente para la ausencia de inmunoglobulinas séricas de ratón mediante ELISA.

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

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

5

10 Configuración experimental

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

15

Las bacterias de *L. lactis* modificadas por ingeniería se administran por vía oral a ratones SCID utilizando un catéter gástrico, utilizando diferentes intervalos de tratamiento y dosis comenzando un día después de la reconstitución de PBMC. La inducción de la tolerancia oral se evalúa al medir anticuerpos IgE séricos humanos, análisis de infiltración pulmonar, medición de AHR y análisis de poblaciones celulares y producción de citoquinas en el BALF. Adicionalmente, la inducción de la tolerancia se evalúa mediante análisis de la respuesta de células T proliferativa contra Der p 1.

Evaluación de la capacidad de respuesta de las vías respiratorias (AHR)

20

La capacidad de respuesta de las vías respiratorias (expresada como dosis provocadora de carbacol que causa un aumento del 50% en la resistencia pulmonar) se mide el día 35 o el día 60 según lo descrito por Duez et al. 2000.

Mediciones de IgE humana

25

Varios días después del trasplante con células humanas, los ratones se sangran desde el seno retroorbital bajo anestesia. La IgE humana total se investiga mediante un método inmuno-radiométrico de dos sitios con el uso de dos mAb de ratón diferentes específicos para la  $\epsilon$ -cadena (Immunotech International, Luminy, Francia). Se utilizan por lo menos 20  $\mu$ l de suero en una prueba duplicada. La sensibilidad del método permite la detección de 0.1 IU/ml (0.24 ng/ml).

30

El Ab IgE específico contra el alérgeno Dpt se cuantifica por ELISA. Brevemente, los tubos de plástico (Maxisorb Startube, Nunc, Dinamarca) se recubren durante la noche con alérgeno Dpt en tampón carbonato/bicarbonato 0.1 M (pH 9.6) a 4 °C y saturado con BSA al 1% en PBS 0.1 M (pH 7.4) durante 2 h a temperatura ambiente. Después del lavado, los tubos se incuban durante 2 h a temperatura ambiente y durante la noche a 4 °C con suero de ratones Hu-SCID diluido en PBS que contiene BSA (1%) y Tween (0.01%). Después de lavados extensos, se agrega un Ab de IgE antihumano marcado con HRP. Después del lavado, se agrega sustrato [3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) sustrato reactivo, Pharmingen, Becton Dickinson, Erembodegem, Bélgica] a cada pozo. Finalmente, las reacciones se detienen al agregar  $H_2SO_4$  1 M a los pozos. Las absorbancias se leen a 450 nm.

35

Examen histológico del pulmón

Los pulmones se extirpan en el día 35 y se fijan en paraformaldehído y se procesan para la inclusión de parafina. Las secciones de tejido de parafina se tiñen para la detección de células CD45+ humanas después de lo cual las células humanas en las secciones de pulmón de murino se cuantificaron por puntuación histológica como se describe por Duez et al. 2000.

40

Análisis del líquido de lavado broncoalveolar (BALF)

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

Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citoquinas:

45

Las suspensiones de células individuales de bazo se preparan al pasar las células a través de filtros de células de 70  $\mu$ m (Becton/Dickinson Labware). Los eritrocitos se eliminan de las suspensiones de células de bazo por incubación con tampón de lisis de glóbulos rojos. Las células T CD4+ y las células T CD4+CD25- se enriquecen utilizando el kit de aislamiento de células T CD4+ humano (Miltenyi Biotec, Alemania) o el kit de aislamiento de células T reguladoras CD4+CD25+ humanas (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).

50

Ensayos de proliferación de esplenocitos en masa, se cultivan  $2 \times 10^5$  células en placas de fondo en U de 96 pozos en un volumen total de 200  $\mu$ l de medio completo solo o con Der p 1 purificado, y con o sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti -IL-10 o anti-TGF- $\beta$ . Der p 1 se agrega en concentraciones que varían de 1 a 100  $\mu$ g/ml. Los anticuerpos neutralizantes se agregan a 1, 0.1 y 0.01  $\mu$ g/ml. Para ensayos de proliferación de células T CD4+ humanas y poblaciones de células T CD4+ CD25- humanas,  $2 \times 10^5$  células t CD4+ o células T o CD4+CD25- cultivadas en placas de 96 pozos con fondo U con CMSP humanas tratadas con mitomicina que están cargadas con 1 mg/ml de Der p 1

5 durante 16 h, que actúan como células presentadoras de antígeno, en relaciones de célula T CD4<sup>+</sup> o célula T CD4<sup>+</sup>CD25/APC 1/1, 1/0.3, 1/0.1, 1/0.03, 1/0 en un volumen total de 200 µl de medio completo con o sin anticuerpos neutralizantes. Después de 72 h a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%, la proliferación se evalúa mediante la adición de 1 µCi/pozo de [<sup>3</sup>H]-timidina. La radioactividad unida a ADN se cosecha 18 h más tarde en placas de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

10 Para las mediciones de citoquinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizados en los diferentes ensayos de proliferación se recogieron después de 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelaron a -80 °C hasta que se realiza el análisis de citoquinas. La producción de citoquinas se cuantifica utilizando el Ensayo de perlas citométricas por inflamación humana (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE. UU.).

#### Resultados

LL-OVA y LL-Der p 1 aumentan significativamente la capacidad de inducir tolerancia en modelos de ratones OVA y huSCID para el asma, respectivamente.

15 Para estudiar la inducción de la tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se describió anteriormente (configuración experimental). La adición de LL-OVA/Derp1 mejora significativamente la inducción de tolerancia hacia OVA/Derp1 ya que la respuesta proliferativa específica de alérgeno de los esplenocitos se reduce significativamente en el grupo LL-OVA/Derp1 en comparación con el control y los grupos OVA/Derp1 libres.

LL-OVA/Derp1 potencia la tolerancia oral en asociación con AHR reducida, infiltración eosinofílica, niveles séricos de IgE y disminución de la producción de IL-13, IL-4 e IL-5 en respuesta a dicho alérgeno.

20 Para estudiar la inducción de la tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se describió anteriormente (configuración experimental). La AHR, la infiltración BALF eosinofílica, el título de IgE así como la producción de citoquina en respuesta a dichos antígenos se determinan como se describió anteriormente. El AHR, infiltración BALF eosinofílica, título de IgE se reduce fuertemente, e IL-13, IL-4 e IL-5 disminuyeron significativamente en el grupo LL-OVA/Derp1 en comparación con el control y los grupos OVA/Derp1 libres.

25 LL-OVA/Derp1 mejora la tolerancia oral a través de las células T CD4<sup>+</sup>.

30 Para evaluar si las células T CD4 median en la inducción de la tolerancia oral, se estudia la respuesta de células T CD4 proliferativa específica a alérgeno en los esplenocitos y los ganglios linfáticos. Por lo tanto, los ratones se alimentan oralmente como se describió anteriormente (configuración experimental) y la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> específicas de alérgeno se determina como se describe en Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citoquinas. La respuesta de células T CD4 específicas de alérgeno en el grupo LL-OVA/Derp1 se reduce significativamente en comparación con los grupos de control y OVA/Derp1 libres.

Las células reguladoras T inducidas por antígeno después de la terapia LL-OVA pueden transferir la protección de las respuestas similares al asma in vivo

35 Con el fin de probar la supresión activa de las respuestas similares al asma en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, transferimos adoptivamente esplenocitos de los diferentes grupos tratados como se describió anteriormente (ensayo de actividad reguladora T in vivo). En comparación con los controles y los grupos OVA libres, las respuestas similares al asma se reducen significativamente en el grupo LL-OVA, lo que indica la activación de las células T CD4<sup>+</sup> reguladoras en nuestro protocolo combinado de tolerancia oral.

#### Conclusión

40 Nuestros datos demuestran que la administración en la mucosa de alérgeno que secreta *L. lactis* es más potente que el alérgeno libre para inducir tolerancia inmune específica a alérgeno mediante la inducción de células T reguladoras de CD4<sup>+</sup> específicas de antígeno, incluso en el contexto de una hipersensibilidad establecida.

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

#### 45 Introducción

50 La alergia a los alimentos es una enfermedad que afecta aproximadamente del 2% al 5% de la población. En seres humanos, los anticuerpos IgE elevados, así como la presencia de linfocitos T específicos de antígenos productores de IL-4, sugieren un mecanismo sesgado de Th2. Aquí, se demuestra que el suministro oral de un alérgeno alimentario por *L. lactis* suprime las respuestas inmunes específicas de alérgenos mediante la inducción de células T reguladoras de CD4<sup>+</sup> específicas a antígeno.

#### Material y métodos para los ejemplos

##### Bacterias y plásmidos

- La cepa MG1363 de *L. lactis* se utiliza a lo largo de este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM17, es decir M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 0.5% de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se almacenan a -20°C en 50% de glicerol en GM17. Para las inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 200 veces en GM17 fresco y se incuban a 30°C. Alcanzan una densidad de saturación de  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por mL dentro de las 16 horas. Las bacterias se recolectan por centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100  $\mu$ L de esta suspensión diariamente mediante un catéter intragástrico. El ADNc de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina se amplifica y se fusiona con la señal de secreción de Usp45 del vector pT1 NX resistente a la eritromicina, corriente abajo del promotor P1 lactocócico.
- Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que transportan BLG murino se denominan LL-BLG. LL- pT1 NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1 NX, que sirve como control.
- Cuantificación de  $\beta$ -lactoglobulina bovina (BLG)
- La BLG de LL-BLG se determina utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) específico de BLG desarrollado en casa y análisis de transferencia de Western.
- Configuración experimental
- El modelo murino de alergia a los alimentos utilizado para explorar el efecto protector de *L. lactis* es un modelo de ratón de la respuesta de tipo IgE inducida por los alimentos como se describe por Frossard et al. (J Allergy Clin Immunol 113: 958 - 964, 2004). Los ratones reciben LL-BLG o un antígeno irrelevante (OVA) como control negativo. Como un control positivo para la inducción de la tolerancia, los ratones reciben una alta dosis de BLG en el agua potable que previene a los ratones de la anafilaxia tras la inoculación oral con BLG.
- En un entorno profiláctico, las bacterias *L. lactis* modificadas por ingeniería que producen BLG se administran por vía oral a los ratones utilizando un catéter gástrico, utilizando diferentes intervalos de tratamiento y dosis. Posteriormente, estos ratones receptores se inoculan oralmente con antígeno BLG purificado, en presencia de toxina del cólera. Los animales de control se exponen a *L. lactis* diseñado con un vector de control que no expresa BLG (sino OVA en su lugar). La inducción de la tolerancia se evalúa mediante análisis de anafilaxia después de la exposición al antígeno intragástrico, al medir los títulos de IgG1, IgG2a e IgE específicos de BLG en suero y heces, al determinar el número de células secretoras de anticuerpos en bazo y PP, mediante el análisis de la proliferación de células T y producción de citoquinas en MLN, PP y bazo.
- Para evaluar si la inducción de tolerancia inmune hacia BLG podría potenciarse mediante *L. lactis*, los ratones se administran con LL-BLG o con 1  $\mu$ g de BLG libre.
- Sensibilización oral a BLG.
- Se inmunizaron ratones hembra C3H/HeOuj de cuatro a cinco semanas (Charles River) en los días 0, 7, 14 y 21 por sonda intragástrica con 20 mg de BLG (Sigma) y 10  $\mu$ g de CTX, adquiridos de List Biological Laboratories en 0.2 mol/L de NaHCO<sub>3</sub>. El grupo de control positivo (ratones tolerizados) recibe 0.8 mg/mL de BLG en el agua de bebida ad libitum durante 4 semanas. La cantidad total de proteína administrada (22.4 mg) es similar a la cantidad total de BLG dada a los ratones sensibilizados. Para demostrar que el procedimiento de tolerización también activa de forma duradera el sistema inmunitario periférico y no solo la mucosa, se inyecta un grupo de ratones tolerizados dos veces con 80  $\mu$ g de BLG por vía ip adsorbido a 1 mg de alumbre en los días 28 y 42.
- Inoculación de antígeno
- El día 28, todos los ratones se inocularon mediante sonda intragástrica con 100 mg de BLG en 0.4 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.2 mol. La anafilaxia se observa y clasifica mediante el uso de una puntuación de reacción (0, sin reacción, a 3, reacción grave o muerte) descrita en detalle en otra parte (Frossard et al., 2001). La temperatura corporal central se mide por infrarrojos en la oreja antes de la inoculación y 30 minutos después de la sonda. Los animales se sacrifican y la sangre se recoge mediante punción cardíaca en tubos que contienen EDTA, y se obtiene plasma para la medición de la histamina mediante un kit de ELISA comercial (Immunotech, Marsella, Francia).
- Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citoquinas
- Las suspensiones de células individuales de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y PP se preparan como se describe por Frossard et al. (2004). Las células T CD4<sup>+</sup> y las células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> se enriquecen utilizando el kit de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Alemania) o el kit de aislamiento de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Alemania), respectivamente y columnas MACS (midiMACS; Miltenyi Biotec).
- Ensayos de proliferación de poblaciones de esplenocitos y LN en masa, se cultivan  $2 \times 10^5$  células en placas de fondo en U de 96 pozos en un volumen total de 200  $\mu$ l de medio completo solo o con BLG purificado, y con o sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF- $\beta$ . La BLG se agrega a concentraciones que varían de 1 a 100  $\mu$ g/ml. Los anticuerpos neutralizantes se agregan a 1, 0.1 y 0.01  $\mu$ g/ml. Para ensayos de proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>, se cultivan  $2 \times 10^5$  células T CD4<sup>+</sup> o células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> en placas en U de 96

- 5 pozos con esplenocitos tratados con mitomicina que están cargadas con 1 mg/ml de BLG durante 16 h, que actúan como células presentadoras de antígeno, en relaciones de célula T CD4<sup>+</sup> o célula T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>/APC 1/1, 1/0.3, 1/0.1, 1/0.03, 1/0 en un volumen total de 200 µl de medio completo con o sin anticuerpos neutralizantes. Después de 72 h a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%, la proliferación se evalúa mediante la adición de 1 µCi/pozo de [<sup>3</sup>H] - timidina. La radioactividad unida a ADN se cosecha 18 h más tarde en placas de filtro de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer).
- 10 Para las mediciones de citoquinas, los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizados en los diferentes ensayos de proliferación se recogieron después de 24, 48 y 72 h de cultivo y se congelaron a -80 °C hasta que se realice el análisis de citoquinas. La producción de citoquinas se cuantifica utilizando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratones (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE. UU.).
- Ensayo de actividad reguladora T in vivo
- 15 Con el fin de evaluar la supresión activa de la formación de anticuerpos en ratones, esplenocitos, células T CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificados con perlas aisladas de los diferentes grupos experimentales tratados con L Lactis se transfieren adoptivamente a ratones C3H/HeOuj sin tratamiento previo. Los ratones no tratados se utilizan como control. El número de células transferidas es de 10<sup>7</sup> para células de bazo enteras, células de bazo empobrecidas en subpoblación o células CD4<sup>+</sup> seleccionadas positivamente y células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Si las Tregs están implicadas, la inoculación posterior de estos ratones con el antígeno BLG debería evitar la inducción de respuestas inmunes humorales contra BLG y anafilaxia.
- Inmunoensayos ligados a enzimas para anticuerpos de suero y heces específicos de BLG.
- 20 Los sueros se obtienen de las hemorragias de la cola los días 0, 7, 14, 21 y 28. Las heces se obtienen al mismo tiempo y se resuspenden en PBS más FCS al 1% (Life technologies) suplementado con pepstatina 1:1000 (Fluka) a 0.1 mg/ml. Las muestras se desagregan mecánicamente y se agitan vorticialmente durante 2 minutos, seguido de dos centrifugaciones a 4 °C durante 20 minutos a 14,000 rpm.
- 25 Los sueros y las heces se ensayan para niveles de anticuerpos IgE, IgG1, IgG2a y/o IgA específicos de BLG mediante un método adaptado de Adel-Patient et al. (2000, J. Immunol Methods). En resumen, las placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc) se recubren durante 18 horas a temperatura ambiente con estreptavidina (Fluka) de 250 ng/pozo, seguido de 300 µL de una solución de polivinilpirrolidón K25 (Fluka) durante la noche. Se incuba un microgramo de BLG biotilado durante 3 horas y se diluyen los sueros (1:6666 y 1:2222 para IgG1, 1:666 y 1:222 para IgG2a, 1:66 y 1:22 para IgE) o heces (1:3, 1:10 y 1:33) en PBS más 10% de suero de caballo se agrega por duplicado en presencia de 0.5 µg/ml de anticuerpos marcados con IgA anti-ratón de cabra, IgG1 anti-ratón de rata o peroxidasa IgG2a anti-ratón (Southern Biotechnologies) durante 2 horas. Para la medición de IgE, se agrega un Ab de IgE antirratón de rata monoclonal (clon R35-72, BD Pharmingen) seguido de un Ab anti-rata acoplado a peroxidasa (Caltag). La densidad óptica se mide a 490 nm. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias, con sueros combinados de BLG más ratones inmunizados con alumbre utilizados como suero de referencia.
- 30 La producción de anticuerpos específicos de antígeno se mide por medio de ELISPOT.
- 35 Los parches de Peyer se extirpan mecánicamente del intestino y se incuban durante 30 minutos en medio HBSS suplementado con 5 mmol de EDTA (Life Technologies). De manera similar, los parches de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos se Trituran suavemente y se filtran a través de un filtro de nylon de 70 µm. Las células del bazo se preincuban durante 5 minutos en NH<sub>4</sub>Cl tamponado con Tris para eliminar los glóbulos rojos. Los linfoblastos se aíslan en un gradiente Percoll 60%/66% (Amersham).
- 40 Para la medición de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgA específicos de BLG, las placas ELISPOT (Millipore) se recubren con estreptavidina durante la noche a 37 °C, seguido de la adición de 1 µg de BLG biotilado durante 3 horas. Los linfoblastos aislados en un gradiente de Percoll 60%/66% de se resuspenden en dos concentraciones diferentes, 1 y 2x10<sup>6</sup> en medio de Dulbecco modificado de Iscove complementado con penicilina, estreptomycin, L-glutamina, gentamicina, polimixina B y 5% de FCS durante 24 horas a 37 °C, seguido de una incubación durante la noche a 4 °C con anticuerpos anti-IgA, anti-IgG1 y anti-IgG2a (Southern Biotechnology). Se agrega amino-etil-carbazol, 100 µL/pozo, durante 10 minutos, y las manchas se cuentan automáticamente al utilizar software KS ELISPOT 4.2. 1 (Zeiss) y expresado como unidades formadoras de células por 10<sup>6</sup> células (CFU).
- 45 LL-BLG mejora significativamente la capacidad inductora de tolerancia de BLG en el modelo murino de alergia a los alimentos
- 50 Para estudiar la inducción de la tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se describió anteriormente (configuración experimental). La adición de LL-BLG mejora significativamente la inducción de tolerancia hacia BLG ya que la respuesta proliferativa específica de alérgeno de los esplenocitos se reduce significativamente en el grupo LL-BLG en comparación con los grupos control y BLG libres.
- 55 LL-BLG potencia la tolerancia oral en asociación con una respuesta de anticuerpos específica de BLG reducida y una producción reducida de citoquinas de IL-4 en respuesta a dicho alérgeno.

Para estudiar la inducción de la tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se describió anteriormente (configuración experimental). La respuesta de anticuerpos específicos de BLG y la producción de citoquinas en respuesta a dicho factor se determinan como se describió anteriormente. Los niveles de anticuerpos específicos de BLG e IL-4 se reducen significativamente en el grupo LL-BLG en comparación con los grupos control y BLG libres.

5 Resultados

LL-BLG mejora la tolerancia oral a través de las células T CD4<sup>+</sup>.

Para evaluar si las células T CD4 median la inducción de la tolerancia oral, se estudia la respuesta de célula T CD4 proliferativa específica a alérgeno en los esplenocitos y los ganglios linfáticos. Por lo tanto, los ratones se alimentan oralmente como se describió anteriormente (configuración experimental) y la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> específicas de alérgeno se determina como se describe en Cultivos celulares, proliferación y ensayo de citoquinas. La respuesta de células T CD4 específicas de alérgeno en el grupo LL-BLG se reduce significativamente en comparación con los grupos control y BLG libres.

Las células reguladoras T inducidas por antígeno después de la terapia LL-BLG pueden transferir la protección de respuestas de tipo alérgico in vivo

15 Con el fin de probar la supresión activa de las respuestas de tipo alérgico en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, transferimos adoptivamente esplenocitos de los diferentes grupos tratados como se describió anteriormente [Ensayo de actividad reguladora T in vivo]. En comparación con los controles y los grupos BLG libres, las respuestas de tipo alérgico se reducen significativamente en el grupo LL-BLG, lo que indica la activación de las células T CD4<sup>+</sup> reguladoras en nuestro protocolo combinado de tolerancia oral.

20 Conclusión

Nuestros datos demuestran que el suministro a la mucosa del alérgeno que secreta *L. lactis* es más potente que el alérgeno libre para inducir la tolerancia inmune específica del alérgeno mediante la inducción de células T reguladoras de CD4<sup>+</sup> específicas del antígeno.

25 EJEMPLO F: Inducción de tolerancia a la insulina después de la administración oral de *L. lactis* que secreta dicho autoantígeno.

Introducción

La autoinmunidad se caracteriza por daño tisular inflamatorio espontáneo y por deterioro de la función fisiológica resultante de la pérdida de tolerancia al autoantígeno. Se asocia con un sistema inmunitario parcialmente hiperactivo, que se caracteriza por un exceso de células T auxiliares (Th). Los factores predisponentes, tales como los genes de susceptibilidad y los factores ambientales son difíciles de influenciar, por lo tanto, los esfuerzos recientes para desarrollar inmunoterapias se centran en restablecer el equilibrio funcional entre las células efectoras patógenas y las células T inmunorreguladoras al agotar la primera y/o mejorar la última. La destrucción autoinmune de las células beta de los islotes pancreáticos es la causa principal de la diabetes mellitus tipo 1 (T1D). Esta destrucción se asocia con respuestas inmunes celulares y humorales a diversos autoantígenos de células beta, los cuales pueden preceder al inicio clínico de la enfermedad.

35 Aquí, se demuestra que el suministro oral de un autoantígeno que libera *L. lactis* suprime las respuestas inmunes específicas de diabéticos mediante la inducción de células T reguladoras de CD4<sup>+</sup> específicas de antígeno.

Material y métodos

40 Bacterias y plásmidos La cepa MG1363 de *L. lactis* se utiliza a lo largo de este estudio. Las bacterias se cultivan en medio GM 17, es decir M17 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 0.5% de glucosa. Las suspensiones madre de todas las cepas se almacenan a -20°C en 50% de glicerol en GM17. Para las inoculaciones intragástricas, las suspensiones madre se diluyen 200 veces en GM 17 fresco y se incuban a 30 °C. Alcanzan una densidad de saturación de 2 x 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por mL dentro de las 16 horas. Las bacterias se recolectan por centrifugación y se concentran 10 veces en medio BM9. Para el tratamiento, cada ratón recibe 100 µL de esta suspensión diariamente mediante un catéter intragástrico.

Se sintetizan secuencias de ADN con el uso óptimo del codón de *L. lactis* que codifica el péptido II B24-C36 de proinsulina humana (hplp), la insulina porcina y el péptido inmunodominante InsB<sub>9-23</sub> (B9-23 es esencialmente el mismo en muchas especies humanas, ratas y ratones) amplifican y fusionan a la señal de secreción de Usp45 del vector pT1 NX resistente a la eritromicina, corriente abajo del promotor P1 lactocócico.

50 Las cepas MG1363 transformadas con plásmidos que transportan hplp murino, Insulina, InsB<sub>9-23</sub> se denominan LL-hplp, LL-insulina, LL-InsB<sub>9-23</sub>. LL-pT1 NX, que es MG1363 que contiene el vector vacío pT1 NX, que sirve como control. La expresión de estas proteínas se determina utilizando ELISA específico de antígeno y análisis de transferencia Western.

Ratones

Ratones diabéticos machos y hembras no obesos (NOD) y ratones con inmunodeficiencia combinada severa a NOD (SCID) (antecedente Balb/c) se adquieren del laboratorio Jackson. Los ratones Balb/c de tipo silvestre (WT) se adquieren de Charles River Italia. Los ratones se mantienen en una instalación central de animales libre de patógenos. Los ratones se tratan y utilizan de acuerdo con las pautas institucionales.

5 Configuración experimental

10 En un entorno profiláctico, LL-hplp, LL-insulina, LL-InsB<sub>9-23</sub> se administran por vía oral a ratones NOD a partir del día 21 de edad (destete) y utilizando el régimen de alimentación óptimo o hasta los 100 días de edad (cuando la mayoría de los ratones desarrollan diabetes). Adicionalmente, LL-pT1 NX se administra por vía oral como control negativo. Para el grupo de control positivo (tolerizante), los ratones NOD de 3 semanas de edad se tratan por vía oral con 0.8 mg de insulina humana/hplp/InsB<sub>9-23</sub> durante 3 veces a la semana durante 2 o 4 semanas. El desarrollo de la diabetes se determina mediante el monitoreo continuo de los niveles de glucosa en la orina tres veces por semana y en el caso de la glucosuria, el control de los niveles de glucosa en sangre. Los páncreas se recolectan a las 12-23 semanas y al final del experimento (35 semanas), y las secciones en serie se tiñen con hematoxilina/eosina para puntuar la infiltración de células mononucleares o por inmunohistoquímica para analizar la infiltración de células T.

15 En un contexto terapéutico, LL-hplp, LL-insulin, LL-InsB<sub>9-23</sub> se administran por vía oral a hembras NOD diabéticas que muestran glucosuria e hiperglucemia estables (12-23 semanas). Adicionalmente, LL-pT1 NX se administra por vía oral como control negativo. Para el grupo de control positivo (tolerizante), los ratones NOD diabéticos se tratan como se describe en Bresson et al. 2006. La remisión completa se define como la desaparición de glucosuria y un regreso a la glucemia normal.

20 En un entorno de trasplante singénico de islotes, los ratones hembra NOD con diabetes de inicio reciente se tratan por vía oral durante 3 semanas con LL-hplp, LL-insulina, LL-InsB<sub>9-23</sub> o con LL-pT1 NX como control negativo. Después de 3 semanas, se trasplantan 500 islotes pancreáticos recién aislados de ratones NOD no diabéticos a ratones NOD diabéticos. La glucosa en sangre luego se monitoriza 3 veces por semana hasta la recurrencia de la diabetes o hasta 15 semanas después del injerto. Los animales con 2 niveles de glucosa consecutivos  $\geq$  250 mg/dL se consideran diabéticos y posteriormente serán sacrificados para la recolección del suero y el análisis histológico del injerto.

Los mecanismos precisos de la inducción de tolerancia se analizan in vitro, in vivo después de volver a inocular a los ratones NOD con autoantígenos específicos y mediante transferencia adoptiva de células T en ratones NOD-SCID.

Detección de diabetes:

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

35 Insulitis: los ratones se matan por asfixia con CO<sub>2</sub> y el páncreas se fija en formalina al 10% durante la noche, se incorpora en parafina, y las secciones en serie de 5  $\mu$ m se tiñen con hematoxilina y eosina. La puntuación de insulitis (media  $\pm$  SD) se determina midiendo microscópicamente el grado de infiltración celular en 10-15 islotes/ratón de la siguiente manera: 0. sin señal visible de infiltración de islotes; 1, infiltración peri-islámica; 2, <50% de infiltración; 3, > 50% de infiltración.

40 Aislamiento y trasplante de islotes: islotes de ratones NOD donantes sin insulitis y diabetes de 14 a 21 días se aíslan después de la eliminación aséptica mediante la digestión de las glándulas pancreáticas con colagenasa en solución salina equilibrada de Hanks durante agitación vigorosa. El aislamiento de islotes se lleva a cabo mediante recolección directa manual bajo un estereomicroscopio. Los ratones NOD receptores diabéticos se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de avertina (0.02 ml/g de BWT), se expuso el riñón izquierdo mediante incisión lumbar y se administraron 500 islotes recién aislados bajo la cápsula renal.

Inmunohistoquímica

45 Para detectar insulina, la expresión de CD4 y CD8 en células pancreáticas  $\beta$ , Ab primario (insulina anti-cerdo de conejillo de indias de Dako [dilución 1:300], anti-CD4 RM4.5 y anti-CD8a IHC de BD Biosciences [dilución 1:50] se aplican a secciones de tejido congelado como se describe en Christen et al., 2004.

Ensayo de proliferación in vitro

50 Se preparan suspensiones de células individuales de bazo, LN mesentérico (MLN) y PLN. Los ensayos de proliferación de poblaciones totales de esplenocitos, se cultivan  $2 \times 10^5$  células en placas de fondo en U de 96 pozos en un volumen total de 200  $\mu$ l de medio completo solo o con concentraciones graduadas (1-100  $\mu$ g/ml) de insulina humana purificada o péptidos específicos para células T CD4 (InsB<sub>9-23</sub>, H-2<sup>d</sup> o <sup>q</sup> restringido) o para células T CD8 (InsB<sub>15-23</sub>, K<sup>d</sup> restringido) (Sigma), y con o sin anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-IL-10 o anti-TGF- $\beta$ . Los anticuerpos neutralizantes se agregan a 1, 0.1 y 0.01  $\mu$ g/ml. Para ensayos de proliferación de células T CD3+ totales, células T CD8+, células T CD4+ y poblaciones de células T CD4+ CD25-, se cultivan  $0.2 \times 10^5$  células T en placas de fondo en U de 96 pozos con  $1 \times 10^5$  esplenocitos irradiados de ratones WT Balb/c cargados con insulina o GAD65 o péptidos específicos para células T

5 CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, en un volumen total de 200 µl de medio completo con o sin anticuerpos neutralizantes. Después de 72 h a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%, la proliferación se evalúa mediante la adición de 1 µCi/pozo de [<sup>3</sup>H] -timidina. La radioactividad unida a ADN se cosecha 16-18 horas después en esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) y la incorporación de timidina se mide en un contador de centelleo (Perkin Elmer). Las células T se purifican a partir de PLN o bazos mediante selección negativa a través de separación de perlas magnéticas utilizando el kit de aislamiento CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (MACS, Milteny Biotec, Auburn, CA). Las células T CD4<sup>+</sup> se utilizan como células totales o se separan adicionalmente en CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>-</sup> mediante MACS utilizando el kit de aislamiento CD25<sup>+</sup> (Milteny Biotec). La pureza (> 90%) de las poblaciones celulares se determina por análisis de citometría de flujo.

10 Para las mediciones de citoquinas, los sobrenadantes de los cultivos de células utilizados en los diferentes ensayos de proliferación (estimulación específica de antígeno), descritos anteriormente, se recogieron después de 72 h de cultivo y se congelaron a -80°C hasta que se realizó el análisis de citoquinas. La producción de citoquinas se cuantifica utilizando el ensayo de perlas citométricas de inflamación de ratones (BD Biosciences, Mountain View, CA, EE. UU.). Las células T CD3<sup>+</sup> purificadas, las células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> se cultivan y estimulan in vitro no específicamente con una mezcla anti-CD3/anti-CD28 (1 µg/ml cada una) durante 24 horas o permanecen sin estimular como control. Los sobrenadantes se recolectan y analizan para la producción de IL-10, IL-4, IL-5 e IFN $\gamma$  utilizando conjunto de flexión Cytometric de Matriz de Perla Citométrica BD™ en un Bioanalizador BD FACSAarray utilizando el software de matriz FCAP (BD Biosciences). Los experimentos de captura de ELISA se utilizan para determinar TGF- $\beta$ 1 utilizando el kit Quantikine (R&D Systems).

#### Ensayo de inhibición de la proliferación de células T in vitro

20 Se cultivaron simultáneamente 2 x 10<sup>4</sup> células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> esplénicas totales aisladas de NOD hembra diabético (8 - 12 semanas) con cantidades variables de células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> y poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> aisladas del bazo, MLN o PLN de los diferentes grupos experimentales en presencia de 2 x 10<sup>4</sup> esplenocitos cargados con insulinas irradiadas agotadas de células T - o de péptidos de ratones WT Balb/c. Después de 72 h a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%, la proliferación se evalúa mediante la adición de 1 µCi/pozo de [<sup>3</sup>H] -timidina. La radioactividad unida al ADN se cosecha 16-18 horas después en esteras filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer, Boston, EE. UU.) y la incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo (Perkin Elmer).

#### Ensayo de citotoxicidad in vitro

30 Los objetivos de linfoblastos utilizados son los esplenocitos activados con Con A de ratones BALB/c. Un total de 10<sup>6</sup> células objetivo se marcan con 100 µCi de <sup>51</sup>Cr (Amersham International, Buckinghamshire, U.K) durante 90 minutos a 37°C, se lavan tres veces y luego se incuban con 1 µg/ml de péptido (InsB<sub>15-23</sub> o un péptido irrelevante) a 37 °C durante 1 h. Las células objetivo se lavan dos veces y se siembran a 10<sup>4</sup> células por pozo. Las células T CD8<sup>+</sup>, aisladas del bazo, MLN y PLN se agregan a cada pozo, por triplicado, a varias relaciones de efector: objetivo (E: T). Las placas se centrifugan a 500 rpm durante 2 min, y se incuban a 37 °C durante 4 h. Después de la incubación, se recogen los sobrenadantes para la determinación de la liberación de <sup>51</sup>Cr [% de lisis = 100 x (cpm de prueba - cpm espontánea)/(cpm total - cpm espontánea)]. Para el ensayo de muerte indirecta, las células T CD8<sup>+</sup> se incuban con 5 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (clon 145-2C11, Pharmingen) antes de la incubación con efectores.

#### Transferencia adoptiva de diabetes

40 Se inyectaron ratones NOD-SCID a las 8-10 semanas i.v. con 2 x 10<sup>7</sup> o i.p. con 5 x 10<sup>6</sup> esplenocitos aislados de ratones NOD hembra diabéticos (6 semanas, 12 semanas y 18 semanas) combinados con o sin números graduales de células CD3<sup>+</sup> T purificadas en perlas, células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> aisladas de diferentes grupos tratados con L.-lactis experimentales. Los ratones no tratados se utilizan como control. El desarrollo de la diabetes se determina mediante la monitorización continua de los niveles de glucosa en sangre tres veces por semana.

#### Resultados

LL-hp1p, LL-insulina, LL-InsB<sub>9-23</sub> retrasa la recurrencia de la diabetes después del trasplante singénico de islotes

45 Para evaluar si el LL-hp1p, LL-Insulina y LL-InsB (9-23) inducen tolerancia oral, se estudia la recurrencia de la diabetes después del trasplante de islotes singénico. Por lo tanto, los ratones se alimentan oralmente como se describió anteriormente (configuración experimental) y los islotes pancreáticos se transplantan como se describe (aislamiento y trasplante de islotes). La recurrencia de la diabetes se retrasa en el grupo LL-hp1p/insulina/InsB<sub>9-23</sub> en comparación con el control.

50 El LL-hp1p, LL-insulina o LL-InsB<sub>9-23</sub> aumentan significativamente la capacidad inductora de tolerancia de freehp1p, insulina o InsB<sub>9-23</sub> en el ratón diabético no obeso

55 Para estudiar la inducción de la tolerancia oral, los ratones se alimentan por vía oral como se describió anteriormente (configuración experimental). La adición de LL-hp1p, LL-insulina, LL-InsB<sub>9-23</sub> mejora significativamente la inducción de tolerancia hacia el autoantígeno ya que la respuesta proliferativa específica de autoantígenos de los esplenocitos se reduce significativamente en el grupo LL-hp1p/insulina/InsB<sub>9-23</sub> en comparación con los grupos de control y hp1p/insulina/InsB<sub>9-23</sub> libres.

5 El LL-hpllp, LL-insulina o LL-InsB<sub>9-23</sub> potencian la tolerancia oral en asociación con insulinitis reducida, tasa de muerte de la destrucción de células beta y aumento de la producción de IL-10 por esplenocitos Para estudiar la inducción de la tolerancia oral, los ratones son alimentados oralmente como se describió anteriormente (configuración experimental). La presencia de insulinitis, la velocidad de destrucción de células beta y la producción de citoquinas en respuesta a dicho autoantígeno se determina como se describió anteriormente. El análisis histológico muestra un grado significativamente menor de insulinitis y destrucción de células beta y aumento de la producción de IL-10 en el grupo LL-hpllp/insulina/InsB<sub>9-23</sub> en comparación con los grupos de hpllp/insulina/InsB<sub>9-23</sub> de control y libres.

LL-hpllp, LL-insulina, LL-InsB<sub>9-23</sub>? 3 mejora la tolerancia oral a través de células T CD4<sup>+</sup>

10 Para evaluar si las células T CD4 median en la inducción de la tolerancia oral, se estudia la respuesta proliferativa CD4 de células T específicas de autoantígeno en los esplenocitos y los ganglios linfáticos. Por lo tanto, los ratones se alimentan oralmente como se describió anteriormente (configuración experimental) y la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> específicas de autoantígenos se determina como se describe (ensayo de proliferación in vitro). La respuesta de células T CD4 específicas de autoantígeno en el grupo LL-hpllp/insulina/InsB<sub>9-23</sub> en comparación con los grupos de hpllp/insulina/InsB<sub>9-23</sub> de control y libres.

15 Ejemplo F5: Las respuestas CD8<sup>+</sup> autoagresivas se suprimen en ratones NOD después de terapia con LL-InsB<sub>9-23</sub>

Para examinar si nuestro enfoque combinado induce células T CD4<sup>+</sup> supresoras que son capaces de modular la diabetes mediante mecanismos supresores de activación inespecífica, analizamos el efecto sobre las células T autoagresivas CD8<sup>+</sup>. El porcentaje y/o actividad de las células CD8<sup>+</sup> autoagresivas específicas de antígeno se reduce fuertemente después de la terapia con LL-InsB<sub>9-23</sub>.

20 Células reguladoras T inducidas por antígeno después de terapia con LL-InsB<sub>9-23</sub> la terapia pueden transferir protección de respuestas autoinmunes in vivo

25 Con el fin de evaluar la supresión activa de respuestas tipo diabéticas en ratones tratados con el protocolo de tolerancia oral, transferimos adoptivamente esplenocitos de los diferentes grupos tratados como se describió anteriormente (transferencia adoptiva de diabetes). En comparación con los controles y el grupo InsB<sub>9-23</sub> libre, las respuestas diabéticas se reducen significativamente en el grupo LL-InsB<sub>9-23</sub>, lo que indica la activación de las células T CD4<sup>+</sup> reguladoras en nuestro protocolo combinado de tolerancia oral.

#### Conclusión

Se demuestra que el suministro oral de un autoantígeno que suministra *L. lactis* suprime las respuestas inmunes específicas de diabéticos mediante la inducción de células T reguladoras de CD4<sup>+</sup> específicas de antígeno.

#### 30 Discusión

En general, los datos presentados anteriormente indican que la suplementación oral de un antígeno secretor de *L. lactis* genéticamente modificado puede disminuir la inflamación sistémica inducida por ese antígeno, incluso en un sujeto sensibilizado. Ventajosamente, la supresión mediada por *Lactococcus* a menudo parece ser más potente que después de la administración por la mucosa del antígeno libre. Potencialmente, la supresión puede estar mediada por la inducción de células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup>.

#### Referencias

- Friedman A. and Weiner, H.L. (1994). Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. Proc. Natl. Acad. Sci, 91, 6688-6692.
- 40 - Gasson, M.J. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J. Bacteriol. 154, 1-9 (1983).
- Liu, et al., (2006) Engineered vaginal *Lactobacillus* strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor Cyanovirin-N. A.A.C. 50, 3250-3259.
- Marietta, E. et al. A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. J. Clin. Invest 114, 1090-1097 (2004).
- 45 - Mayer, L. and Shao, L. (2004a). The use of oral tolerance in the therapy of chronic inflammatory/autoimmune diseases. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 39, S746-S747.
- Mazzarella, G. et al. An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients. Gut 52, 57-62 (2003).
- 50 - Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J. and Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. J. Clin. Invest. 115, 1923-1933.

## ES 2 666 658 T3

- Steidler, L. and Rottiers, P. (2006) Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Ann N Y Acad. Sci.* 1072, 176-186.
- 5 - Strobel, S., Mowat, A.M., Drummond, H.E., Pickering, M.G. and Ferguson, A. (1983) Immunological responses to fed protein antigens in mice. II oral tolerance for CMI is due to activation of cyclophosphamide-sensitive cells by gut-processed antigen. *Immunology*, 49, 451-456.
- Tobagus, I.T., Thomas, W.R., & Holt, P.G. Adjuvant costimulation during secondary antigen challenge directs qualitative aspects of oral tolerance induction, particularly during the neonatal period. *J. Immunol.* 172, 2274-2285 (2004).
- Van Asseldonk, M. et al. Cloning of Usp45, A Gene Encoding A Secreted Protein from *Lactococcus-Lactis Subsp Lactis Mg1363*. *Gene* 95, 155-160 (1990).
- 10 - Waterfield, N.R., Lepage, R.W.F., Wilson, P.W., & Wells, J.M. The Isolation of Lactococcal Promoters and Their Use in Investigating Bacterial Luciferase Synthesis in *Lactococcus-Lactis*. *Gene* 165, 9-15 (1995).

### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ACTOGENIX N.V.
- <120> Tratamiento de enfermedad inmune mediante suministro a la mucosa de antígenos
- 15 <130> AGX-019-EPDIV
- <150> EP 07447006.3
- <151> 2007-01-25
- <150> EP 07112792.2
- <151> 2007-07-19
- 20 <160> 31
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 54
- <212> ADN
- 25 <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia de ADN que codifica el epítipo DQ8 desaminado
- <400> 1
- caataccat cagggtgaagg ttcattcaa ccatcacaag aaaaccaca agct 54
- 30 <210> 2
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 35 <223> epítipo DQ8 desaminado
- <400> 2

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

Gln Ala

ES 2 666 658 T3

<210> 3  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de ADN que codifica Triticum epítipo DQ8  
 <400> 3  
 caatacccat caggtaagg ttattccaa ccatcacaac aaaaccaca agct 54

<210> 4  
 10 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> epítipo DQ8 de Triticum

15 <400> 4

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

**Gln Ala**

<210> 5  
 <211> 90  
 <212> ADN  
 20 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia de ADN que codifica el epítipo DQ2 desaminado  
 <400> 5

**ttacaattac aaccattccc acaaccagaa ttaccatacc cattaccata cccacaacca 60**  
**gaattaccat acccacaacc acaaccattc 90**

25 <210> 6  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> epítipo DQ2 desaminado  
 <400> 6

ES 2 666 658 T3

Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro  
1 5 10 15

Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro  
20 25 30

**Phe**

<210> 7

<211> 90

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN que codifica epítipo DQ2 de Triticum

<400> 7

ttacaattac aaccattccc acaaccacaa ttaccatacc cattaccata ccacaacca 60

caattaccat acccacaacc acaaccattc 90

10 <210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> Epítipo DQ2 de Triticum

<400> 8

Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro  
1 5 10 15

Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro  
20 25 30

**Phe**

<210> 9

<211> 29

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador: Ovalbúmina de Gallus gallus

<400> 9

25 ggctccatcg gtcagcaag catggaatt 29

<210> 10

- <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>
- 5 <223> cebador: Ovalbúmina de Gallus gallus  
 <400> 10  
 actagttaag gggaaacaca tctgccaag aagagaa 37  
 <210> 11  
 <211> 23
- 10 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: con base en DQ8 de Triticum  
 <400> 11
- 15 caatacccat caggtgaagg ttc 23  
 <210> 12  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial
- 20 <220>  
 <223> cebador: con base en DQ8 de Triticum  
 <400> 12  
 cgactagta agctgtggg tttctgtg at 32  
 <210> 13
- 25 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia de codificación e-tag
- 30 <400> 13  
 ggtgtccag ttccataccc agatccact gaaccacgt 39  
 <210> 14  
 <211> 51  
 <212> ADN
- 35 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador: con base en DQ8 de Triticum

# ES 2 666 658 T3

- <400> 14  
gggtgctccag ttccataccc agatccactt gaaccacgtc aatacccatc a 51
- <210> 15  
<211> 32
- 5 <212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador: con base en DQ8 de Triticum
- <400> 15
- 10 cgactagtta agcttggtggg tttcttgatg at 32  
<210> 16  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial
- 15 <220>  
<223> DQ8 de epítipo de Triticum/e-tag
- <400> 16
- |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Gly</b> | <b>Ala</b> | <b>Pro</b> | <b>Val</b> | <b>Pro</b> | <b>Tyr</b> | <b>Pro</b> | <b>Asp</b> | <b>Pro</b> | <b>Leu</b> | <b>Glu</b> | <b>Pro</b> | <b>Arg</b> | <b>Gln</b> | <b>Tyr</b> | <b>Pro</b> |
| 1          |            |            |            | 5          |            |            |            |            | 10         |            |            |            |            | 15         |            |
- 
- |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Ser</b> | <b>Gly</b> | <b>Glu</b> | <b>Gly</b> | <b>Ser</b> | <b>Phe</b> | <b>Gln</b> | <b>Pro</b> | <b>Ser</b> | <b>Gln</b> | <b>Glu</b> | <b>Asn</b> | <b>Pro</b> | <b>Gln</b> | <b>Ala</b> |
|            |            |            | 20         |            |            |            |            | 25         |            |            |            |            | 30         |            |
- <210> 17
- 20 <211> 29  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador: Ovalbúmina de Gallus gallus
- 25 <400> 17  
ggctccatcg gtgcagcaag catggaatt 29  
<210> 18  
<211> 37  
<212> ADN
- 30 <213> secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador: Ovalbúmina de Gallus gallus  
<400> 18

actagttaag gggaaacaca tctgccaag aagagaa 37

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador: Beta-actina mus musculus

<400> 19

acgacatgga gaagatctgg 20

10 <210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador: Beta-actina de mus musculus

<400> 20

tcgtagatgg gcacagtgtg 20

<210> 21

<211> 24

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador: IL-13 de mus musculus

<400> 21

25 tcttgctgc ctggtggtc tcgc 24

<210> 22

<211> 25

<212> ADN

<213> secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador: IL-13 de mus musculus

<400> 22

gatggcattg caattggaga tgttg 25

<210> 23

35 <211> 24

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador: eotaxina de mus musculus  
<400> 23  
gggcagtaac ttccatctgt ctcc 24  
5 <210> 24  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
10 <223> Cebador: eotaxina de mus musculus  
<400> 24  
cacttcttct tggggtcagc 20  
<210> 25  
<211> 20  
15 <212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador: IL-10 de mus musculus  
<400> 25  
20 tacctggtag gagtgatecc 20  
<210> 26  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
25 <220>  
<223> Cebador: IL-10 de mus musculus  
<400> 26  
gcatagaagc atacatgatg 20  
<210> 27  
30 <211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador: IFN-gamma de mus musculus  
35 <400> 27  
catagatgtg gaagaaaaga 20  
<210> 28

ES 2 666 658 T3

- <211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Cebador: IFN-gamma de mus musculus  
<400> 28  
ttgctgaaga aggtagtaat 20  
<210> 29  
<211> 20  
10 <212> ADN  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador: TGF-Beta de mus musculus  
<400> 29  
15 ctttaggaag gacctgggtt 20  
<210> 30  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Cebador: TGF-Beta de mus musculus  
<400> 30  
caggagcgca caatcatgtt 20  
<210> 31  
25 <211> 13  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial  
<220>  
<223> epítipo DQ8/e-tag  
30 <400> 31

**Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg**  
**1 5 10**

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un microorganismo que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno para uso en el tratamiento de una respuesta inmune relacionada con una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica y enfermedad de injerto contra anfitrión, en un sujeto humano, en el que dicho antígeno se expresa y secreta constitutivamente por dicho microorganismo, en el que dicho microorganismo es una bacteria *Lactococcus sp.*, y dicho antígeno es para ser administrado a través de suministro a la mucosa, y en el que dicho sujeto humano ha establecido hipersensibilidad a dicho antígeno.
2. El microorganismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la respuesta inmune relacionada con la enfermedad es una enfermedad autoinmune.
- 10 3. El microorganismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la respuesta inmune relacionada con la enfermedad es una enfermedad alérgica.
4. El microorganismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la respuesta inmune relacionada con la enfermedad es enfermedad de injerto contra anfitrión.
- 15 5. El microorganismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 3, en el que dicha enfermedad alérgica se selecciona de asma alérgica y una alergia a alimentos.
6. El microorganismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha enfermedad autoinmune se selecciona de diabetes tipo 1, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple, uveítis autoinmune, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis autoinmune, y artritis reumatoide.
- 20 7. El microorganismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1.
8. El microorganismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha enfermedad autoinmune es enfermedad celíaca.
9. El microorganismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho microorganismo se:
- 25 - administra diariamente;
- suministra durante por lo menos 1 semana;
- suministra por lo menos una vez al día;
- suministra en una dosis de por lo menos 10 femtogramos a 100 mg por día; y/o
- 30 - suministra en una formulación seleccionada de pulverización, cápsula, aerosol, pastillas oblongas, bolo, comprimido, bolsitas, líquido, suspensión, emulsión, y pastillas.
10. El microorganismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho suministro a la mucosa se selecciona de suministro rectal, suministro bucal, suministro pulmonar, suministro ocular, suministro nasal, suministro vaginal, y suministro oral.
11. El microorganismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que
- 35 - dicho antígeno induce células T reguladoras (Treg);
- dicho antígeno reduce la proliferación de células del nódulo linfático de bazo e inguinal; y/o
- dicho antígeno suprime una respuesta de célula T específica a antígeno inflamatoria.
12. El microorganismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho microorganismo se formula como un medicamento, alimento médico, nutracéutico o bebida.
- 40 13. El microorganismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que una construcción genética que codifica dicho antígeno se integra en el genoma de dicho microorganismo.
14. El microorganismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho microorganismo se suministró por vía de la mucosa a dicho sujeto diariamente.
- 45 15. El microorganismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que bacteria *Lactococcus sp.* es *Lactococcus lactis*.

- 5 16. Una composición farmacéutica que comprende un microorganismo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de una respuesta inmune relacionada con una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica y enfermedad de injerto contra anfitrión, en un sujeto humano, en la que dicho microorganismo secreta constitutivamente un antígeno, que está involucrado en la inducción de una respuesta inmune relacionada con la enfermedad, en la que el microorganismo es una bacteria *Lactococcus sp.*, y en la que dicho sujeto humano ha establecido hipersensibilidad a dicho antígeno.
17. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que dicha respuesta inmune relacionada con la enfermedad se selecciona de asma alérgica, una alergia a alimentos, una enfermedad autoinmune y enfermedad de injerto contra anfitrión.
- 10 18. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 16 o reivindicación 17, en la que dicho microorganismo es *Lactococcus lactis* (LL).
19. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la que:
- dicho microorganismo está presente en una dosis de por lo menos 10 femtogramos (fg) a 100 mg; y/o
  - dicha composición farmacéutica está en una formulación seleccionada de pulverizaciones, cápsulas, aerosoles, 15 pastillas oblongas, bolo, comprimidos, bolsitas, líquidos, suspensiones, emulsiones, y pastillas.
20. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en la que:
- dicho antígeno induce células T reguladoras (Treg);
  - dicho antígeno reduce la proliferación de células del nódulo linfático de bazo e inguinal; y
  - dicho antígeno suprime una respuesta de célula T específica a antígeno inflamatoria.
- 20 21. El microorganismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o la composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que dicho antígeno es un péptido derivado de gliadina.

FIGURA 1

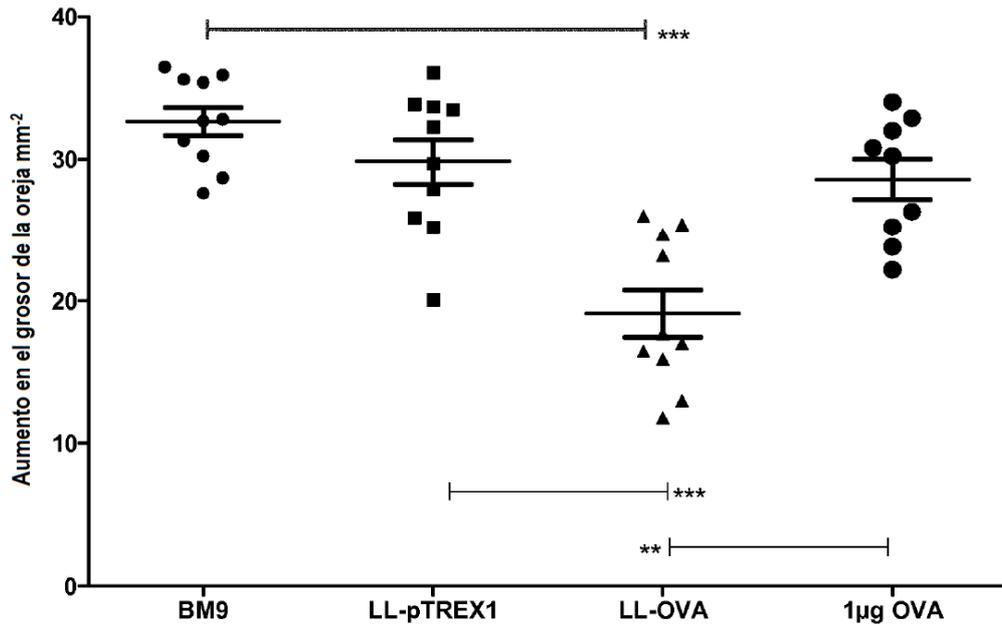


FIGURA 2

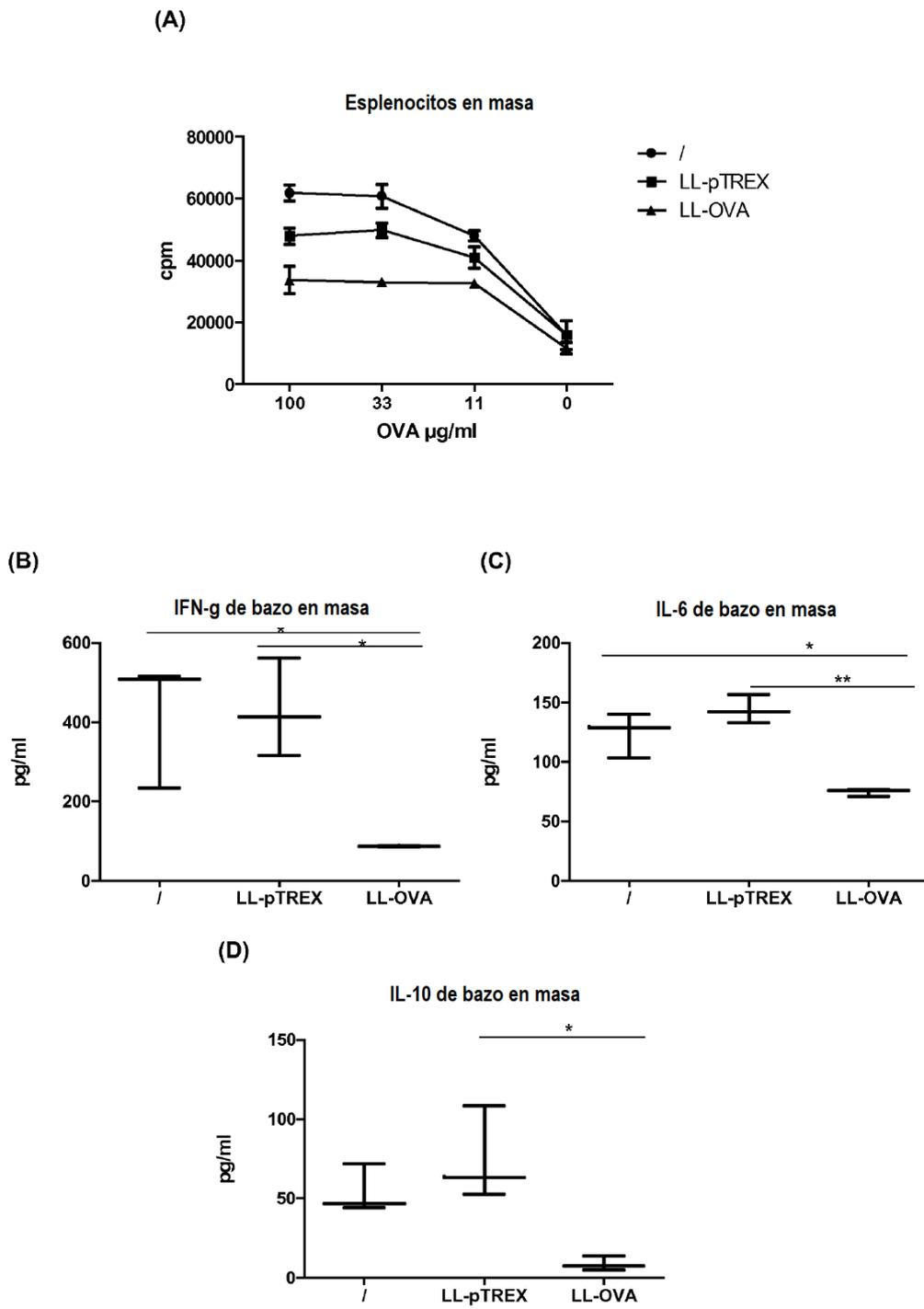


FIGURA 3

Bazo CD4<sup>+</sup>

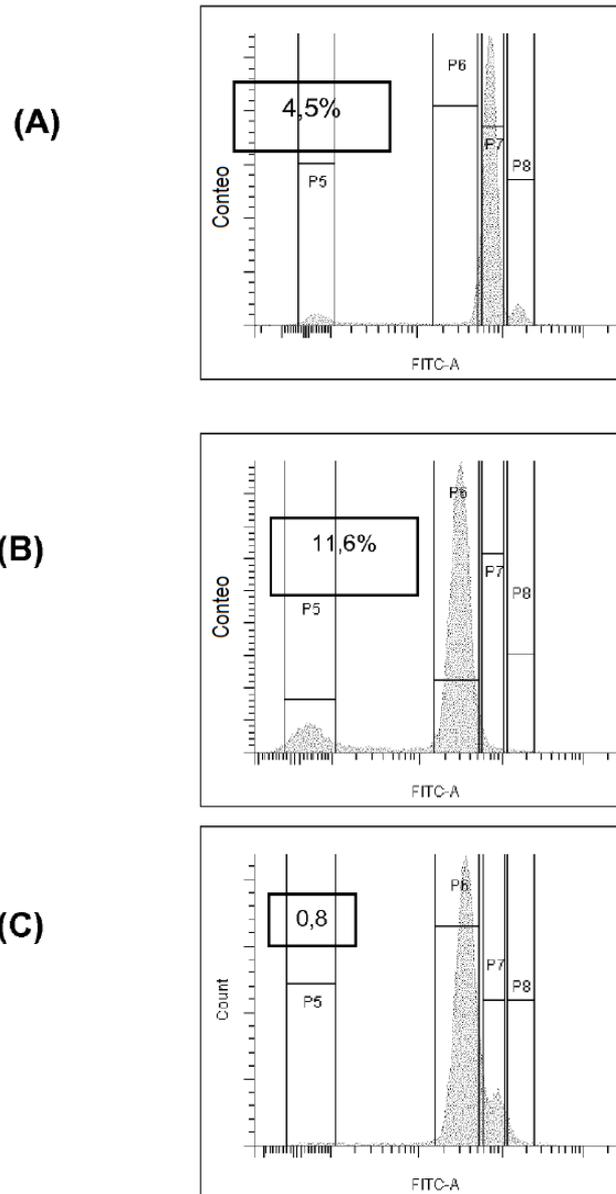


FIGURA 4

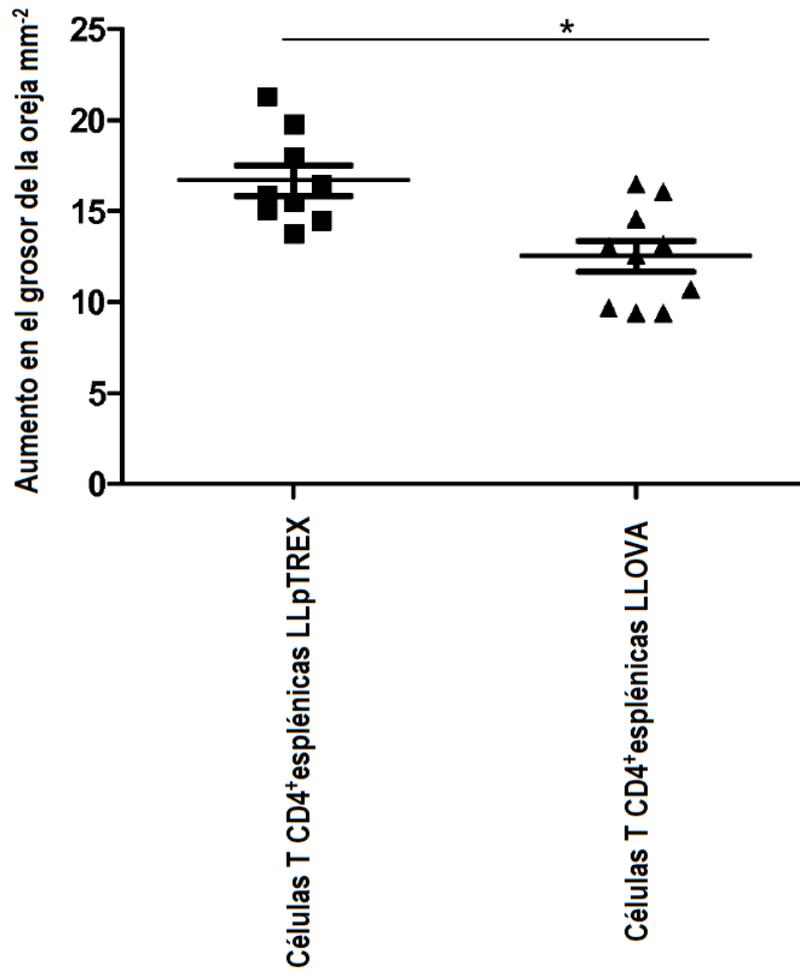


FIGURA 5

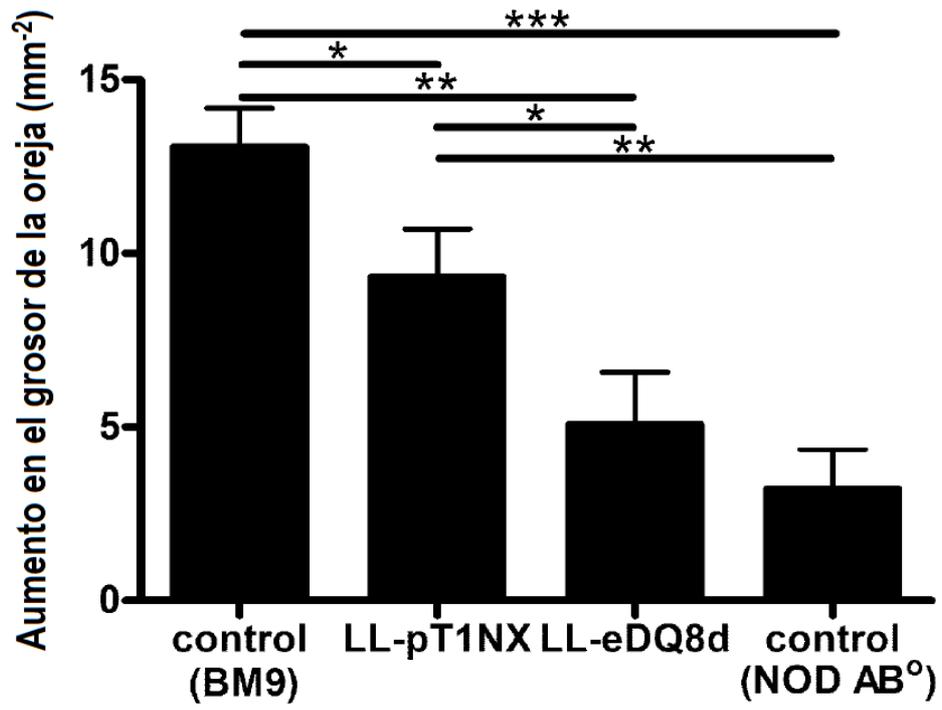


FIGURA 6

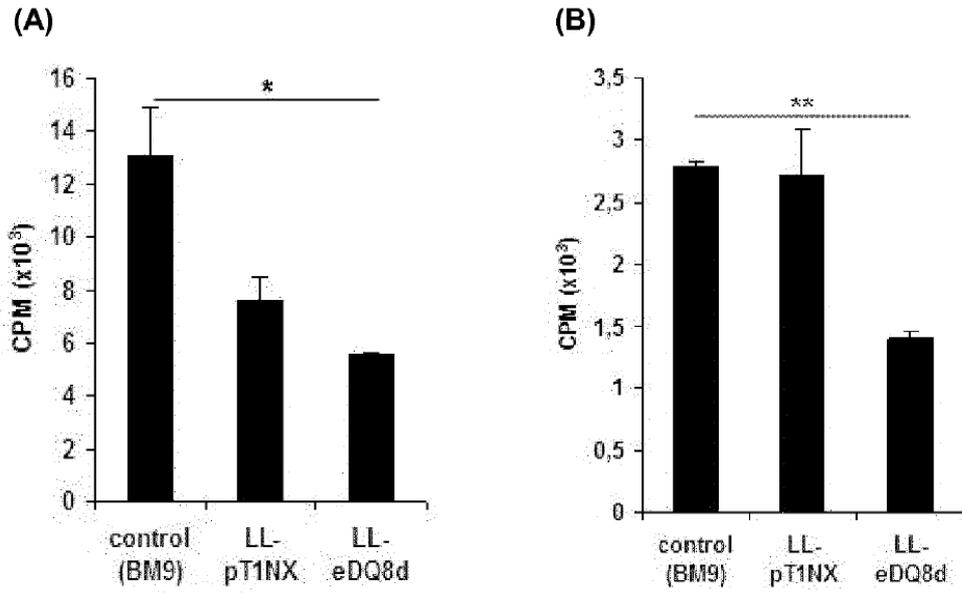
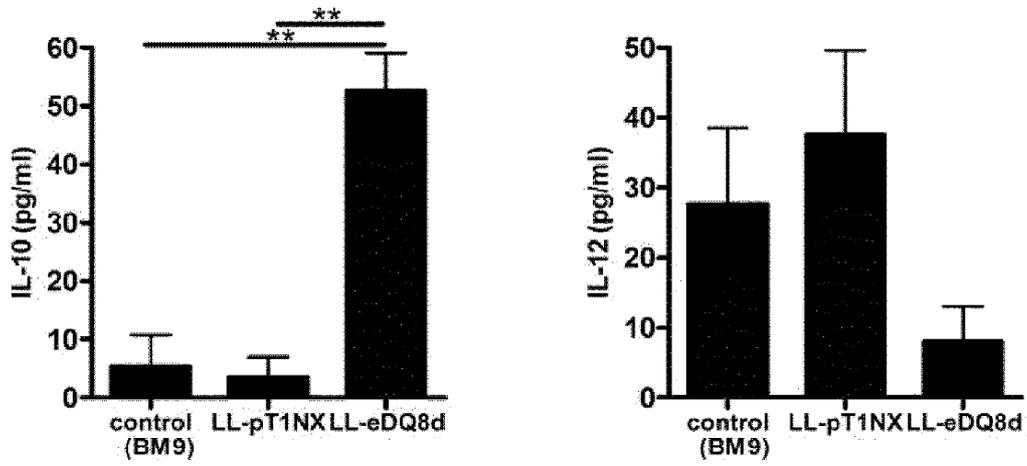


FIGURA 7

(A)



(B)

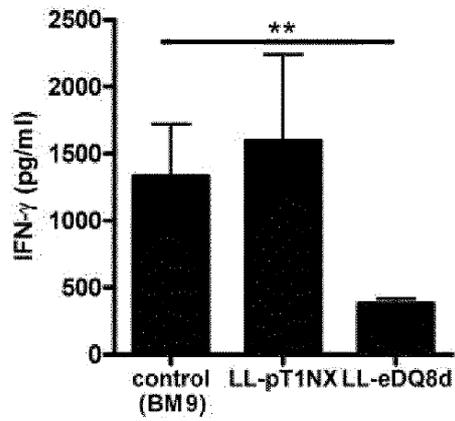


FIGURA 8

