



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0615547-2 A2**

(22) Data de Depósito: 24/05/2006

(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)



* B R P I 0 6 1 5 5 4 7 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*

A61K 39/395 2006.01

C07K 16/10 2006.01

A61K 35/74 2006.01

A23L 1/03 2006.01

(54) Título: **PRODUTO ALIMENTÍCIO, PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO ALIMENTÍCIO, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO, USOS DA PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE FORNECIMENTO DE BENEFÍCIOS À SAÚDE DO INTESTINO E IMPLEMENTOS DE LIBERAÇÃO PARA USO COM PRODUTO ALIMENTÍCIO**

(30) Prioridade Unionista: 19/08/2005 EP 05076940.5

(73) Titular(es): Unilever N.V

(72) Inventor(es): Adrianus Marinus Ledebøer, Lars-Goran Lennart Hammarstrom, Leo Gerardus Joseph Frenken

(74) Procurador(es): Carolina Nakata

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006005060 de 24/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/019901 de 22/02/2007

(57) Resumo: PRODUTO ALIMENTÍCIO, PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO ALIMENTÍCIO, MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO, USOS DA PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE FORNECIMENTO DE BENEFÍCIOS À SAÚDE DO INTESTINO E IMPLEMENTOS DE LIBERAÇÃO PARA USO COM PRODUTO ALIMENTÍCIO A presente invenção refere-se a produtos alimentícios ou preparações farmacêuticas que compreendem anticorpos ou fragmentos de anticorpos que são ativos no intestino e microorganismos probióticos independentes dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos. Particularmente, a presente invenção refere-se a método de preparação de produtos alimentícios e preparações farmacêuticas que compreendem os anticorpos ou fragmentos de anticorpos e microorganismos probióticos e o uso desses produtos para fornecer benefícios à saúde de seres humanos.

**“PRODUTO ALIMENTÍCIO, PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE
FABRICAÇÃO DE PRODUTO ALIMENTÍCIO, MÉTODO DE FABRICAÇÃO
DE PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO,
USOS DA PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE FORNECIMENTO
5 DE BENEFÍCIOS À SAÚDE DO INTESTINO E IMPLEMENTOS DE
LIBERAÇÃO PARA USO COM PRODUTO ALIMENTÍCIO”**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a produtos alimentícios ou
preparações farmacêuticas que compreendem anticorpos ou fragmentos de
10 anticorpos que são ativos no intestino e microorganismos probióticos
independentes dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos. Particularmente, a
presente invenção refere-se a método de preparação de produtos alimentícios
e preparações farmacêuticas que compreendem os anticorpos ou fragmentos
de anticorpos e microorganismos probióticos e ao uso desses produtos para
15 fornecer benefícios à saúde de seres humanos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Anticorpos (também denominados imunoglobulinas) são
glicoproteínas que reconhecem especificamente moléculas exógenas.
Estas moléculas exógenas reconhecidas são denominadas antígenos.
20 Quando antígenos invadem seres humanos ou animais, é acionada
reação imunológica que envolve a produção de anticorpos por linfócitos
B. Por meio desta reação imunológica, microorganismos, parasitas
maiores, vírus e toxinas bacterianas podem ser tornados inofensivos. A
capacidade exclusiva de anticorpos de reconhecer especificamente e
25 unir-se com alta afinidade a virtualmente qualquer tipo de antígeno torna-
os moléculas úteis em pesquisa médica e científica.

Em vertebrados, são descritas cinco classes de imunoglobulina,
que incluem IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, todas as quais diferem de função no

sistema imunológico. IgGs são as imunoglobulinas mais abundantes no sangue. Elas possuem estrutura básica de dois polipeptídeos de cadeia pesada (H) idênticos e dois polipeptídeos de cadeia leve (L) idênticos. As cadeias H e L são mantidas juntas por pontes de dissulfeto e uniões não covalentes. As
5 próprias cadeias podem ser divididas em domínios variáveis e constantes. Os domínios variáveis da cadeia pesada e leve (V_H e V_L) que são extremamente variáveis em seqüências de aminoácidos estão localizados na parte N-terminal da molécula de anticorpo. V_H e V_L juntos formam o local de reconhecimento de antígenos exclusivo. As seqüências de aminoácidos dos domínios C-terminais
10 restantes são muito menos variáveis e são denominadas C_H1 , C_H2 , C_H3 e C_L .

A parte de ligação não antígeno de molécula de anticorpo é denominada domínio constante F_c e media diversas funções imunológicas, tais como união a receptores sobre células alvo e fixação de complementos.

O local de ligação de antígenos exclusivo de anticorpo consiste
15 dos domínios variáveis de cadeia leve e pesada (V_H e V_L). Cada domínio contém quatro regiões de estrutura (FR) e três regiões denominadas CDRs (regiões de determinação de complementaridade) ou regiões hipervariáveis. As CDRs variam fortemente de seqüência e determinam a especificidade do anticorpo. Os domínios V_L e V_H juntos formam local de ligação que une
20 antígeno específico.

Vários fragmentos de anticorpos de ligação de antígenos funcionais poderão ser elaborados por meio de proteólise de anticorpos, utilizando, por exemplo, digestão de papaína, digestões de pepsina ou outras abordagens enzimáticas. Esse método pode ser utilizado para gerar Fab, Fv ou
25 fragmentos com domínio isolado.

Fragmentos de Fab são os domínios de ligação de antígenos de molécula de anticorpo. Fragmentos de Fab podem ser preparados por meio de digestões de papaína de anticorpos inteiros. Fragmentos de Fv são o

fragmento mínimo (cerca de 30 kDa) que ainda contém o local de ligação de antígenos inteiros de anticorpo IgG inteiro. Fragmentos de Fv são compostos de domínios de cadeia pesada variável (V_H) e cadeia leve variável (V_L). Este heterodímero, denominado fragmento Fv (para variável de fragmento) ainda é capaz de unir o antígeno.

Desta forma, fragmentos de anticorpos menores podem ser sintetizados e estes fragmentos terão vantagem sobre anticorpos inteiros em aplicações que necessitem de penetração nos tecidos e rápida liberação do sangue ou rim.

A produção *in vitro* de anticorpos tem sido possível desde o desenvolvimento de tecnologia de anticorpos monoclonais. Isso gerou o uso de anticorpos em muitas áreas que incluem pesquisa, medicina e, recentemente, em aplicações de consumo. Estas aplicações, entretanto, dependem da produção em larga escala de anticorpos e geralmente envolvem o uso do próprio anticorpo ou fragmento de anticorpo, ou seja, a proteína colhida de sistema de expressão de anticorpos.

Escherichia coli vem sendo utilizado como sistema de expressão para a produção de fragmentos de anticorpos. *E. coli* é facilmente acessível para modificações genéticas, requer meios baratos e simples para crescimento rápido e podem ser facilmente cultivados em fermentadores, permitindo a produção em larga escala de proteínas de interesse.

Além disso, em artigo recente, *In situ Delivery of Passive Immunity by Lactobacilli Producing Single-Chain Antibodies*, *Nature Biotechnol.* (2002) 20, 702-706, Kruger et al relataram a produção de fragmentos de anticorpos scFv contra *Streptococcus mutans* pela bactéria de grau alimentício grama positiva *Lactobacillus zeae*. Este tratamento envolveu o fornecimento *in situ* de imunidade passiva em locais da mucosa oral somente quando se demonstra que os fragmentos de anticorpos de cadeia isolada fornecem

proteção contra cárie dental em ratos.

Lactobacilos foram pesquisados com relação às suas propriedades antidiarréicas desde a década de 1960 (Beck, C. et al, *Beneficial Effects of Administration of Lactobacillus acidophilus in Diarrhoeal and other Intestinal Disorders*, *Am. J. Gastroenterol.* (1961) 35, 522-30. Quantidade limitada de testes controlados recentes demonstrou que certas linhagens de lactobacilos podem possuir propriedades terapêuticas e profiláticas em gastroenterite viral aguda (Mastretta, E. et al, *Effect of Lactobacillus CG and Breast-Feeding in the Prevention of Rotavirus Nosocomial Infection*, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2002) 35, 527-531). Também se demonstrou que linhagens selecionadas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* exercem fortes efeitos adjuvantes sobre a reação imunológica sistêmica e da mucosa.

Lactobacilos são bactérias bem conhecidas aplicadas na fabricação de produtos alimentícios. Iogurte, por exemplo, é normalmente fabricado por meio de fermentação de leite com, entre outros, linhagem de *Lactobacillus*. O produto acidificado fermentado, que ainda contém *Lactobacillus* viável, é resfriado e consumido no momento desejado.

Outra aplicação de *Lactobacillus* em produtos alimentícios é a produção de produtos de carne, tais como linguiças. Aqui, o *Lactobacillus* é adicionado à massa de carne antes da aplicação do invólucro, seguido por período de amadurecimento no qual tem lugar o processo de fermentação.

Ainda outra aplicação de *Lactobacillus* na fabricação de produtos alimentícios é o tratamento em salmoura de legumes tais como repolho, cenoura, azeitonas ou beterraba. Aqui, o processo de fermentação natural pode ser controlado por meio da adição de cultivo inicial de *Lactobacillus* apropriado.

A aplicação de *Lactobacillus* em produtos alimentícios é freqüentemente associada a vários efeitos à saúde; vide, por exemplo, A. C.

Ouwehand et al em *Int. Dairy Journal* 8 (1998) 749-758. Particularmente, a aplicação de produtos é associada a vários efeitos à saúde, tais como relativos ao bem estar intestinal, como IBS (Síndrome Intestinal Irritável), redução da má digestão de lactose, sintomas clínicos de diarreia, estímulo imunológico, atividade antitumores e aumento da absorção de minerais.

WO 99/23221 descreve proteínas de ligação de antígenos multivalentes para desativar fagos. Os hospedeiros podem ser bactérias de ácido láctico que são utilizadas para produzir fragmentos de união de anticorpos que são recuperados. WO 99/23221 descreve a adição dos fragmentos de anticorpos colhidos a bactérias para fornecer efeitos antidiarréicos.

WO 00/65057 refere-se à inibição de infecções virais, utilizando proteínas de ligação de antígenos monovalentes. A proteína de ligação de antígenos pode ser domínio variável de cadeia pesada derivado de imunoglobulina naturalmente isento de cadeias leves, tais como os derivados de camelídeos conforme descrito em WO 94/04678. WO 00/65057 descreve a transformação de hospedeiro com gene que codifica as proteínas de ligação de antígenos monovalentes. Hospedeiros apropriados podem incluir bactérias de ácido láctico. Esta revelação refere-se ao campo de processamento de fermentação e o problema de infecção de fagos que dificulta a fermentação. Especificamente, fragmentos VHH de lhama são utilizados para solucionar o problema de infecção de fagos por meio da neutralização de bacteriófago P2 de *Lactococcus lactis*.

Tanto WO 00/65057 quanto WO 99/23221 envolvem o uso de fragmentos de anticorpos colhidos de sistema de expressão bacteriana.

US 6.605.286 refere-se ao uso de bactérias grama positivas para fornecer polipeptídeos biologicamente ativos, tais como citoquinas, ao corpo. US 6.190.662 e EP 0.848.756 B1 referem-se a métodos de obtenção da expressão na superfície de proteína desejada ou polipeptídeo. Monedero et al,

Selection of Single-Chain Antibodies Against the VP8 Subunit of Rotavirus VP4 Outer Capsid Protein and Their Expression in L. casei, *Applied and Environmental Microbiology* (2004) nº 4, 6936-6939, refere-se a estudos *in vitro* sobre o uso de anticorpos de fita única (scFv) expressos por *L. casei* que reconhecem o VP8 e a fração de capsídeo externo de rotavírus e bloqueia infecções com rotavírus *in vitro*. Entretanto, nenhum destes documentos descreve o uso de imunoglobulinas de cadeia pesada ou fragmentos do tipo VHH ou VNAR ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos.

Outros microorganismos utilizados na fabricação de produtos alimentícios incluem leveduras. Levedura é bem conhecida em fermentação e cozimento e seus produtos alimentícios associados incluem, por exemplo, pão e cerveja.

Uma desvantagem desses sistemas conhecidos é que o uso dos próprios anticorpos ou fragmentos de anticorpos (ou seja, a proteína colhida) no tratamento de doença em seres humanos pode resultar na degradação ou digestão do anticorpo antes que forneçam os benefícios à saúde desejados e até antes que atinjam o local desejado.

Além disso, é freqüentemente desejável garantir que o anticorpo ou fragmento de anticorpo seja ativo em região específica do corpo, tal como no intestino.

Além disso, é desejável que sejam fornecidos benefícios à saúde para sejam os mais benéficos possíveis.

Desta forma, a presente invenção pretende fornecer benefícios à saúde de pacientes deles necessitados.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Conforme primeiro aspecto da presente invenção é fornecido produto alimentício ou preparação farmacêutica que compreende i) anticorpos

ou fragmentos de anticorpos que são ativos no intestino e ii) microorganismos probióticos independentes dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos.

Conforme segundo aspecto da presente invenção é fornecido método de elaboração de produto alimentício ou preparação farmacêutica de
5 acordo com o primeiro aspecto que compreende a adição independente dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos e dos microorganismos probióticos durante a fabricação do produto alimentício, preparação farmacêutica ou seu ingrediente.

Conforme terceiro aspecto da presente invenção é fornecido o uso
10 do produto alimentício ou preparação farmacêutica de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção ou fabricado de acordo com o segundo aspecto da presente invenção para fornecer benefícios à saúde do intestino de paciente.

Conforme quarto aspecto da presente invenção é fornecido método de fornecimento de benefícios à saúde do intestino de paciente que
15 compreende a administração do produto alimentício ou preparação farmacêutica de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção ou fabricado de acordo com o segundo aspecto da presente invenção a paciente dele necessitado.

Conforme quinto aspecto da presente invenção é fornecido
20 implemento de liberação para uso com produto alimentício que compreende microorganismos probióticos, em que o implemento de liberação é revestido sobre pelo menos uma superfície com anticorpos ou fragmentos de anticorpos que são ativos no intestino.

Conforme sexto aspecto da presente invenção é fornecido
25 implemento de liberação para uso com produto alimentício em que o implemento de liberação é revestido sobre pelo menos uma superfície com anticorpos ou fragmentos de anticorpos que são ativos no intestino e microorganismos probióticos.

Para evitar dúvidas, a expressão "produto alimentício", da forma utilizada no presente, engloba bebidas.

Pela expressão "bactérias inviáveis", da forma utilizada no presente, indica-se população de bactérias que não é capaz de reproduzir-se sob nenhuma condição conhecida. Deve-se compreender, entretanto, que, devido a variações biológicas normais em população, um pequeno percentual da população (ou seja, 5% ou menos) pode ainda ser viável e, desta forma, capaz de reprodução sob condições de cultivo apropriadas em população que, de outra forma, é definida como inviável.

Pela expressão "bactérias viáveis", da forma utilizada no presente, indica-se população de bactérias que é capaz de reproduzir-se sob condições apropriadas sob as quais é possível a reprodução. Deve-se compreender, entretanto, que, devido a variações biológicas normais em população, um pequeno percentual da população (ou seja, 5% ou menos) pode ainda ser inviável e, desta forma, incapaz de reprodução sob estas condições em uma população que, de outra forma, é definida como viável.

Pela expressão "microorganismos probióticos independentes dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos", da forma utilizada no presente, indica-se que os microorganismos não fazem parte de nenhum sistema de fornecimento para os anticorpos ou fragmentos de anticorpos e não são a eles unidos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Na descrição detalhada das realizações da presente invenção, faz-se referência às figuras a seguir.

As Figuras 1a e b demonstram que partículas de VHH específicas de rotavírus neutralizam rotavírus *in vitro*.

A Figura 2 demonstra que partículas de VHH específicas de rotavírus neutralizam rotavírus *in vivo*.

A Figura 3 exibe mapa de vetores de expressão de *Lactobacillus*:

(a) âncora 2A10;

(b) âncora VHH-1, que media a expressão ancorada na superfície de fragmentos de anticorpos por meio de fusão aos últimos 244 aminoácidos de proteinase P de *L. casei*;

(c) secretado por 2A10; e

(d) secretado por VHH1 com códon de parada (TAA) inserido após a sequência de marca E, mediando a secreção do fragmento de anticorpo.

Tldh: término de transcrição do gene lactato desidrogenase de *L. casei*;

Tld excluído: sequência restante após a exclusão de Tldh;

2A10-scFv: anticorpo de fita única contra VP4/VP7;

VHH1: fragmento de anticorpo de cadeia pesada contra rotavírus; âncora longa, sequência de âncoras do gene proteinase P de *L. casei* (244 aminoácidos);

Tcbh: sequência de término de transcrição do gene hidrolase ácida da bile conjugado de *L. plantarum* 80;

Pldh: sequência promotora do gene lactato desidrogenase de *L. casei*, SS *PrtP*;

sequência de sinal do gene *PrtP* (33 aa), *PrtP* N-terminal, terminal N (36 aminoácidos) do gene *PrtP*;

Amp^r: gene de resistência à ampicilina;

Ery: gene de resistência à eritromicina;

Rep: gene *repA* do plasmídeo p353-2 de *L. pentosis*;

Ori: origem de reprodução (Ori+ = ori *E. coli*, Ori- = ori *Lactobacillus*).

As setas indicam códon de parada.

A Figura 4a exibe os resultados de citometria de fluxo que exibem a expressão de 2A10-scFv (cinza claro) e VHH1 (cinza escuro) sobre a superfície de *Lactobacillus paracasei* por meio de detecção de marca E por anticorpo anti-marca E de camundongo (b) Fotografia de microscópio eletrônico de varrimento (SEM) que exibe a união de rotavírus pela superfície de VHH1 que expressa *Lactobacillus paracasei*.

A Figura 5 exibe resultados de teste de neutralização *in vitro* que testa a eficácia de lactobacilos que expressam fragmentos ancorados a VHH1 para inibir a infecção por rotavírus de células MA104. A redução da infecção para 60% ou mais foi considerada neutralização específica. A linha sólida representa o nível de neutralização atingido por anticorpo VHH1 purificado por marca E produzido por lactobacilos (20 µg/ml). Linha pontilhada indica o nível de neutralização de sobrenadante de hibridoma monoclonal 2A10 (147 ng/ml). Neutralização atingida por diferentes concentrações de lactobacilos ancorados a VHH1 (■), lactobacilos ancorados a 2A10 (■) e lactobacilos não transformados (□).

A Figura 6 (a) exibe a incidência de diarreia em camundongos tratados com lactobacilos que expressam fragmentos ancorados a VHH1. Resultados reunidos de três experimentos (b) Incidência de diarreia em camundongos tratados com lactobacilos que expressam na superfície lactocorpos derivados de 2a10-scFv. Resultados reunidos de três experimentos.

A Figura 7 exibe seções de duodeno e jejuno de filhotes tratados com formulações diferentes, manchadas com hematoxilina e eosina. A barra representa comprimento de 100 µm.

A Figura 8 exibe a carga de RNA *vp7* em amostras de tecido intestinal pequenas conforme determinado por meio de PCR em tempo real.

A Figura 9 exibe a avaliação de diferentes doses de lactobacilos

que expressam fragmentos ancorados a VHH1 e sua eficácia para reduzir a diarreia.

A Figura 10 exibe avaliação de lactobacilos que expressam fragmentos ancorados a VHH1 em forma seca por congelamento.

5 As Figuras 11 (a) e (b) exibem fotografia de microscópio eletrônico de varrimento (SEM) que exibe a união de rotavírus pela superfície de VHH1 que expressa *Lactobacillus paracasei*.

A Figura 12 exibe alinhamento de VHHs que possuem afinidade para partículas virais de rotavírus.

10 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção será agora descrita como forma de exemplo por uma série de realizações.

De forma geral, a presente invenção refere-se a produto alimentício ou preparação farmacêutica que compreende i) anticorpos ou
15 fragmentos de anticorpos que são ativos no intestino e ii) microorganismos probióticos independentes dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos.

I. ANTICORPOS OU FRAGMENTOS DE ANTICORPOS QUE SÃO ATIVOS NO INTESTINO:

Os anticorpos ou fragmentos de anticorpos que são ativos no intestino podem ser utilizados como parte de seu sistema de fornecimento ou não.

20 Segundo realização da presente invenção, prefere-se que os anticorpos ou seus fragmentos compreendem parte de sistema de fornecimento para fornecê-los ao trato gastrointestinal (denominado a seguir "sistema de fornecimento").

Segundo aspecto da presente realização ao utilizar-se sistema de
25 fornecimento dos anticorpos ou seus fragmentos para fornecê-los ao trato gastrointestinal, isso pode ser efetuado por meio do uso de encapsulados, tais como os conhecidos nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Podem ser utilizados biopolímeros naturais. Exemplos incluem alginato de cálcio,

carrageno, goma gelano ou gelatina. O sistema de fornecimento pode ser método de encapsulação conhecido na técnica, que fornecerá a imunoglobulina ou seus fragmentos especificamente para o intestino. O encapsulado deve, portanto, ser capaz de sobreviver até a entrada no intestino e ser liberado em
5 seguida. Esse sistema de fornecimento compreende sistema protetor geral que proteja os anticorpos contra a degradação. Estes métodos podem incluir captura de lipossomos, disco de centrifugação e coaglutinação. Qualquer acionador pode ser utilizado para avisar a liberação do ingrediente encapsulado, tal como alteração de pH (revestimento entérico), tensão
10 mecânica, temperatura e atividade enzimática. Estes métodos são expandidos no artigo de Sebastien Gouin, *Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends, Food Science and Technology* (2004) 15: 330-347. Preferencialmente, utiliza-se revestimento entérico. Além disso, o método de encapsulação pode permitir a liberação lenta do anticorpo no
15 intestino e/ou no estômago. Isso permitirá liberação constante do anticorpo, fragmento funcional ou equivalente ao longo de período de tempo definido.

Alternativamente, de acordo com outro aspecto desta realização, o sistema de fornecimento pode compreender microorganismo, preferencialmente transformado para que seja capaz de produzir os anticorpos
20 ou fragmentos de anticorpos. Este microorganismo é adicional aos microorganismos probióticos indicados no presente como ii) e é independente dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos. Desta forma, para evitar dúvidas, a presente invenção pode compreender dois microorganismos diferentes. O primeiro é o microorganismo probiótico indicado no presente como ii), que não
25 faz parte de nenhum sistema de fornecimento para os anticorpos ou seus fragmentos. O segundo é o microorganismo que pode fazer parte do sistema de fornecimento. O primeiro é indicado no presente como "microorganismo probiótico" e o último como "microorganismo".

Segundo aspecto específico da presente invenção é fornecida preparação farmacêutica que compreende sistema de fornecimento para fornecer anticorpos ao trato gastrointestinal, em que os anticorpos são ativos no intestino e o sistema de fornecimento compreende microorganismo transformado com anticorpos ou seus fragmentos, em que os anticorpos são imunoglobulinas de cadeia pesada do tipo VHH ou seus fragmentos, preferencialmente derivados de camelídeos, de maior preferência anticorpos de cadeia pesada de lhama ou seus fragmentos, ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos e, independentemente, microorganismo probiótico.

Como o microorganismo probiótico, o microorganismo deverá ser preferencialmente capaz de sobreviver à passagem no trato gastrointestinal e deverá ser ativo no estômago/intestino. Preferencialmente, o microorganismo deverá ser capaz de sofrer colonização transitória do trato gastrointestinal; ser capaz de expressar o gene no trato gastrointestinal; e ser capaz de estimular o sistema imunológico do intestino.

Preferencialmente, o microorganismo pode também ser microorganismo probiótico com as características acima. Neste caso, haverá dois microorganismos probióticos utilizados de acordo com a presente invenção; um que é independente dos anticorpos ou seus fragmentos e um que faz parte do seu sistema de fornecimento. Probióticos são definidos como suplementos alimentares microbianos viáveis que influenciam de forma benéfica o hospedeiro melhorando o seu equilíbrio microbiano intestinal de acordo com Fuller (1989), *Probiotics in Man and Animals, Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378. Caso o microorganismo probiótico seja bactéria, prefere-se que seja bactéria de ácido láctico.

Exemplos de outros microorganismos probióticos apropriados incluem levedura tal como *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces* e

Pichia, fungos tais como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Penicillium* e bactérias tais como os gêneros *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* e *Lactobacillus*. Pode-se também utilizar

5 *Kluyveromyces lactis*.

Exemplos específicos de microorganismos probióticos apropriados são:

Kluyveromyces lactis, *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Aspergillus niger*,
 10 *Aspergillus oryzae*, *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*,
L. gasseri, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. lactis*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L.*
 15 *reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. sanfranciscus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Propionibacterium acidilactici*, *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii* e *Streptococcus salivarius*.

Linhagens probióticas específicas são:

20 *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus casei shirōta*, *Lactobacillus casei immunitas*, *Lactobacillus casei* DN-114 001, *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730/SD 2112, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM9843), *Lactobacillus johnsonii* La1 (I-1225 CNCM), *Lactobacillus plantarum* WCFS1,
 25 *Bifidobacterium lactis* HN019, *Bifidobacterium animalis* DN-173010, *Bifidobacterium animalis* Bb12, *Lactobacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus reuteri* ING1, *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Propionibacterium freudenreichii* JS, *Escherichia coli* Nissle 1917.

Convenientemente, o microorganismo pode ser bactéria de ácido láctico. Além disso, preferencialmente, o microorganismo é selecionado a partir de lactobacilos ou bifidobactérias. De preferência ainda maior, o microorganismo é *Lactobacillus*. Particularmente, o *Lactobacillus* é *Lactobacillus casei* 393 pLZ15. *Lactobacillus casei* foi recentemente reidentificado como *Lactobacillus paracasei* (Perez-Martinez, 2003). Outro *Lactobacillus* preferido é *Lactobacillus reuteri*.

Alternativamente, o microorganismo pode ser levedura. Leveduras apropriadas incluem a levedura de padaria *S. cerevisiae*. Outras leveduras como *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica* e *Pichia pastoris*, que são sistemas bem conhecidos de produção de proteínas heterólogas e podem ser utilizadas na presente invenção.

Fungos filamentosos, particularmente espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* possuem a capacidade de secreção de grandes quantidades de proteínas, metabólitos e ácidos orgânicos no seu meio de cultivo. Esta propriedade vem sendo amplamente explorada pelas indústrias de alimentos e bebidas, em que os compostos secretados por essas espécies fúngicas filamentosas vêm sendo utilizados há décadas.

Sistema de fornecimento com base em bactérias probióticas representa abordagem segura e atrativa e representa um dos sistemas de produção de anticorpos mais baratos. A aplicação em ampla escala do microorganismo, preferencialmente *Lactobacillus*, que expressa anticorpos é relativamente fácil e necessita de manipulação e custos de armazenagem mínimos e é econômica.

Preferencialmente, o microorganismo é transformado com vetor de expressão que compreende o gene para o anticorpo. O vetor de expressão pode conter promotor constitutivo a fim de expressar os anticorpos ou seus fragmentos. Esse promotor constitutivo sustentará a expressão *in situ* de

anticorpos por meio de lactobacilos transformados que persistem (ao menos por curto período) no trato intestinal após a administração. Alternativamente, pode-se selecionar promotor que seja ativo somente no trato gastrointestinal e/ou estômago/intestino, ou seja, apropriado somente para expressão específica no trato gastrointestinal. Isso garantirá a expressão e/ou secreção do anticorpo de cadeia pesada de lhama ou seus fragmentos no trato gastrointestinal, preferencialmente no intestino. Muitos promotores constitutivos para lactobacilos são conhecidos na técnica e exemplo de promotor que é especificamente indutível no trato gastrointestinal é *Pldh* (Pouwels et al, *Lactobacilli as Vehicles for Targeting Antigens to Mucosal Tissues by Surface Exposition of Foreign Antigens, Methods in Enzymology* (2001) 336: 369-389).

Os vetores de expressão descritos nos exemplos podem reproduzir-se nos lactobacilos transformados e expressar os anticorpos ou seus fragmentos. Compreender-se-á que a presente invenção não é limitada apenas a esses vetores de expressão de reprodução. O conjunto de expressão inteiro pode ser inserido em chamado plasmídeo de "integração", por meio do quê o conjunto de expressão será integrado ao cromossomo dos lactobacilos após a transformação, conforme conhecido na técnica (Pouwels, P. H. e Chaillou, S., *Gene Expression in Lactobacilli* (2003), *Genetics of Lactic Acid Bacteria*, pág. 143-188). Desta forma, podem ser utilizados vetores de reprodução ou integração de acordo com a presente invenção.

Quando o sistema de fornecimento compreender microorganismo transformado com anticorpos ou seus fragmentos, os anticorpos são expressos e/ou secretados no intestino. Desta forma, o uso de microorganismo como sistema de fornecimento possui as vantagens de que a produção *in vivo* de fragmentos de anticorpos localmente no trato gastrointestinal soluciona o problema prático de degradação de anticorpos administrados por via oral no estômago. Esse sistema baseado em bactérias probióticas representa

abordagem segura e atrativa para o fornecimento de anticorpos para o trato gastrointestinal. Desta forma, a aplicação em larga escala dos lactobacilos que expressam anticorpos é relativamente fácil, requer manipulação e custos de armazenagem mínimos e é econômica. Além disso, as bactérias probióticas
5 permanecerão no intestino por mais tempo e permitirão a produção constante do anticorpo para permitir proteção mais constante contra o microorganismo enteropatogênico.

Convenientemente, a quantidade do microorganismo no sistema de fornecimento em produtos alimentícios de acordo com a presente invenção
10 é de 10^6 a 10^{11} por porção ou (se o tamanho da porção não for conhecido, por exemplo) de 10^6 a 10^{11} por cem gramas de produto, de maior preferência estes níveis são de 10^8 a 10^9 por porção ou por cem gramas de produto.

Os anticorpos para uso de acordo com a presente invenção devem ser ativos no intestino/estômago, ou seja, devem ser funcionais e reter a
15 sua atividade normal, que inclui a desativação do seu alvo. Os anticorpos ativos de acordo com a presente invenção deverão unir-se ao seu alvo conforme normal, de forma que a afinidade de união do anticorpo para o antígeno deverá também ser normal. A afinidade de união está presente quando a constante de dissociação for de mais de 10^5 .

20 Desta forma, o produto alimentício ou a preparação farmacêutica de acordo com a presente invenção será capaz de abordar seletivamente doença específica ou sintoma de doença. A seleção de anticorpo determinará a doença ou o sintoma a ser tratado ou reduzido.

Compreender-se-á que, quando o produto for produto alimentício,
25 qualquer anticorpo pode ser utilizado. Entretanto, quando o produto for preparação farmacêutica, imunoglobulinas de cadeia pesada ou seus fragmentos do tipo VHH ou VNAR ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos são preferidos.

Preferencialmente, o anticorpo ou seus fragmentos deverão possuir uma ou mais das características a seguir:

i. eles exibem boa afinidade de união e a funcionalidade de inibição desejada sob as condições presentes no trato gastrointestinal; e

5 ii. eles possuem boa estabilidade proteolítica pelo fato de serem estáveis contra a degradação por enzimas proteolíticas;

iii. os anticorpos deverão ser termoestáveis, o que possibilita a sua inclusão em uma série de produtos alimentícios. Os produtos alimentícios podem ser preparados em processo que requer pasteurização e prefere-se que
10 a atividade dos anticorpos seja mantida em grande parte apesar do tratamento a quente.

O uso de fragmentos ou partes de anticorpo inteiro que podem, entretanto, exibir afinidade de ligação de antígenos também é contemplado. Fragmentos deverão ser preferencialmente fragmentos funcionais. Fragmento
15 funcional de imunoglobulina indica fragmento de imunoglobulina que exibe afinidade de união para antígeno e possui a mesma atividade biológica da seqüência de comprimento total. Estes fragmentos incluem fragmentos de Fab e scFv. A afinidade de união está presente quando a constante de dissociação for maior que 10^5 . Esse fragmento pode ser convenientemente utilizado em
20 terapia, por exemplo, pois é provável que seja menos imunogênica e mais capaz de penetrar tecidos devido ao seu menor tamanho.

Equivalentes funcionais também são contemplados. Equivalente funcional indica seqüência que exibe afinidade de união para antígeno similar à seqüência de comprimento total. Adições ou exclusões de aminoácidos que
25 não resultem em alteração de funcionalidade, por exemplo, são englobadas pela expressão equivalentes funcionais.

O anticorpo ou seu fragmento deverá poder ser expresso e secretado no intestino. São bem conhecidos na técnica vários testes que

imitam condições do trato gastrointestinal e são utilizados, por exemplo, para selecionar probióticos apropriados que podem sobreviver a condições do trato gastrointestinal. Teste apropriado para determinar se anticorpo pode sobreviver às condições do trato gastrointestinal é descrito por Picot, A. e Lacroix, C. (International Dairy Journal 14 (2004) 505-515).

A fim de determinar se anticorpo será apropriado para uso na presente invenção, pode ser aplicado o teste a seguir. O anticorpo produzido é selecionado sob condições específicas de baixo pH, preferencialmente de 1,5 a 3,5, e na presença de pepsina (protease abundante no estômago) para resultar em moléculas altamente benéficas que funcionam bem no trato gastrointestinal e são apropriadas para uso de acordo com a presente invenção.

O anticorpo ou seu fragmento pode ser de ocorrência natural ou pode ser obtido por meio de engenharia genética utilizando métodos bem conhecidos na técnica.

O anticorpo pode ser selecionado para que seja ativo contra muitos antígenos diferentes, que incluem microorganismos, parasitas maiores, vírus e toxinas bacterianas.

O presente pedido pode ser aplicável à administração de microorganismos enteropatogênicos em geral. Microorganismos enteropatogênicos incluem vírus ou bactérias enteropatogênicas. Compreende-se que a administração indica terapia e/ou profilaxia.

Bactérias enteropatogênicas podem incluir, por exemplo, *Salmonella*, *Campilobacter*, *E. coli* ou *Helicobacter*. É contemplado o uso de anticorpos que desativam *Helicobacter* que causa úlceras do estômago.

Vírus enteropatogênicos podem incluir, por exemplo, norovírus (vírus similar a Norwalk), adenovírus entéricos, coronavírus, astrovírus, calicevírus e parvovírus. Rotavírus e a família Norwalk de vírus são as principais causas de gastroenterite viral, mas uma série de outros vírus é

relacionada a erupções. De maior preferência, a presente invenção refere-se à administração de infecção por rotavírus.

O presente pedido pode também ser utilizado na administração de outros vírus não enteropatogênicos como hepatite.

5 Preferencialmente, imunoglobulinas de cadeia pesada ou seus fragmentos do tipo VHH ou VNAR ou anticorpos de domínio das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos podem ser utilizadas na presente invenção. Essas imunoglobulinas de cadeia pesada do tipo VHH ou VNAR são obtidas utilizando métodos bem conhecidos na técnica. De maior
10 preferência, a imunoglobulina ou seu fragmento é derivada de camelídeos, de maior preferência lhamas.

Van der Linden, R. H. et al, *Comparison of Physical Properties of Llama VHH Antibody Fragments and Mouse Monoclonal Antibodies*, *Biochim. Biophys. Acta* (1990) 1431, 37-46, obtiveram anticorpos de cadeia
15 pesada com alta especificidade e afinidade contra uma série de antígenos. Além disso, imunoglobulinas de cadeia pesada são facilmente clonadas e expressas em bactérias e levedura conforme exibido em Frenken, L. G. J. et al, *Isolation of Antigen Specific Llama V_{HH} Antibody Fragments and their High Level Secretion by Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.* (2000) 78,
20 11-21. Métodos de preparação dessas imunoglobulinas ou seus fragmentos em larga escala que compreendem a transformação de fungo ou levedura com seqüência de DNA que pode ser expressa e codifica o anticorpo ou fragmento também são descritos no Pedido de Patente WO 94/25591 (Unilever). Por fim, EP-A-0584421 descreve regiões de imunoglobulina de
25 cadeia pesada obtidas de camelídeos.

Preferencialmente, os anticorpos podem ser anticorpos de cadeia pesada de lhama, de maior preferência anticorpos VHH ou seus fragmentos. Em 1993, Hamers-Casterman et al revelaram classe inovadora de anticorpos

IgG em camelídeos, ou seja, camelos, dromedários e lhamas (*Naturally Occurring Antibodies of Devoid Light Chains, Nature* (1993) 363, 446-448). Anticorpos de cadeia pesada constituem cerca de um quarto dos anticorpos IgG produzidos pelos camelídeos, lhamas. Estes anticorpos são formados por duas cadeias pesadas, mas são isentos de cadeias leves. A parte de ligação de antígenos variável é indicada como domínio VHH e representa o menor local de ligação de antígenos intacto de ocorrência natural (Desmyter, A. et al, *Antigen Specificity and High Affinity Binding Provided by One Single Loop of a Camel Single-Domain Antibody, J. Biol. Chem.* (2001) 276, 26285-26290).

Anticorpos de cadeia pesada com alta especificidade e afinidade podem ser gerados contra uma série de antígenos e são facilmente clonados e expressos em bactérias e leveduras (Frenken, L. G. J. et al, *Isolation of Antigen Specific Llama V_{HH} Antibody Fragments and their High Level Secretion by Saccharomyces cerevisiae, J. Biotechnol.* (2000) 78, 11-21). Os seus níveis de expressão, solubilidade e estabilidade são significativamente mais altos que os de fragmentos de F(ab) ou Fv clássicos (Ghahroudi, M. A. et al, *Selection and Identification of Single Domain Antibody Fragments from Camel Heavy-Chain Antibodies, FEBS Lett.* (1997) 414, 521-526).

Outra boa fonte de anticorpos de cadeia pesada pode ser encontrada em tubarões. Demonstrou-se recentemente que tubarões também possuem um único domínio similar a VH nos seus anticorpos denominado VNAR (Nuttall et al, *Isolation and Characterization of an IgNAR Variable Domain Specific for the Human Mitochondrial Translocase Receptor Tom70, Eur. J. Biochem.* (2003) 270, 3543-3554; Dooley et al, *Selection and Characterization of Naturally Occurring Single-Domain (IgNAR) Antibody Fragments from Immunized Sharks by Phage Display, Molecular Immunology* (2003) 40, 25-33; Nuttall et al, *Selection and Affinity Maturation of IgNAR Variable Domains Targeting Plasmodium falciparum AMA1, Proteins: Structure,*

Function and Bioinformatics (2004) 55, 187-197). Fragmentos da imunoglobulina tipo VNAR podem ser utilizados.

Holt et al, *Domain Antibodies: Proteins for Therapy, Trends in Biotechnology* (2003): Vol. 21, nº 11: 484-490, analisam fragmentos de ligação de antígenos denominados "anticorpos de domínio" ou dAbs que compreendem apenas o domínio V_H ou V_L de anticorpo e são conseqüentemente menores que, por exemplo, Fab e scFv. DABs são os menores fragmentos de anticorpos de ligação de antígenos conhecidos, variando de 11 kDa a 15 kDa. Eles são altamente expressos em cultivo de células microbianas. Cada dAb contém três das seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de ocorrência natural de anticorpo.

A imunoglobulina ou seu fragmento pode ser monovalente, multivalente (multiespecífica), ou seja bivalente, trivalente, tetravalente, pelo fato de que compreende mais de um local de ligação de antígenos. Os locais de ligação de antígenos podem ser derivados do mesmo anticorpo parental ou seu fragmento ou de diferentes anticorpos que unem o mesmo epítipo. Caso todos os locais de união possuam a mesma especificidade, é produzida imunoglobulina monoespecífica. Alternativamente, imunoglobulina multiespecífica pode ser produzida unindo-se a diferentes epítipos do mesmo antígeno ou mesmo antígenos diferentes. Prefere-se que os locais de união ou pelo menos um deles sejam dirigidos a patógenos (ou seus produtos, tais como enzimas produzidas a partir deles) encontrados no trato gastrointestinal. Prefere-se ainda que a imunoglobulina ou seu fragmento una-se a rotavírus e, de maior preferência, que o neutralize.

A imunoglobulina ou seu fragmento do tipo VHH ou VNAR, ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos, pode ser de ocorrência natural, ou seja permitida *in vivo* mediante imunização de animal com o antígeno desejado, ou fabricada

sinteticamente, ou seja, obtida por meio de métodos de engenharia genética.

Métodos de síntese de genes, que os incorporam a hospedeiros de microorganismos e que expressam genes em microorganismos são bem conhecidos na técnica e os técnicos no assunto seriam facilmente capazes de colocar a presente invenção em prática utilizando conhecimento geral comum. É contemplado o uso de vetores de repetição ou integração.

Segundo realização da presente invenção, o produto alimentício ou a preparação farmacêutica compreende anticorpos que são imunoglobulinas de cadeia pesada ou seus fragmentos do tipo VHH ou VNAR, ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos que são ativos no intestino. Segundo aspecto da presente invenção, o produto alimentício ou a preparação farmacêutica compreende sistema de fornecimento para fornecer os anticorpos mencionados acima ao trato gastrointestinal em que o sistema de fornecimento é microorganismo e as imunoglobulinas são anticorpos derivados de lhamas ou seus fragmentos. Revelamos surpreendentemente que estes microorganismos transformados expressarão anticorpos de cadeia pesada de lhama ou seus fragmentos sobre a sua superfície e podem reduzir a carga viral, normalizar a patologia e reduzir a diarreia em modelo animal de infecção por rotavírus. Além disso, revelou-se que os anticorpos de cadeia pesada de lhama ou seus fragmentos são muito eficazes na redução das infecções em modelos *in vitro* e *in vivo* de infecção por rotavírus. Revelou-se surpreendentemente que fragmentos de anticorpos VHH de lhama reduzem a carga viral, normalizam a patologia e reduzem a diarreia durante infecção por rotavírus.

Seqüências de VHH derivadas de lhama particularmente preferidas que possuem afinidade de rotavírus são fornecidas pelo presente relatório descritivo na listagem de seqüências SEQ ID Nº 1 a 21 e na Figura 12. Alternativamente, seqüências de VHH que contêm pelo menos 70%, 80%,

85%, 90%, 95%, 98% ou 99% de identidade de aminoácidos com SEQ ID N° 1 e que possuem afinidade para partícula de rotavírus ou antígeno também são realizações preferidas de acordo com a presente invenção. Seqüências de VHH podem ser derivadas de camelídeos, por meio de imunização e/ou
5 seleção de afinidade, mas também podem ser derivadas de outras espécies de mamíferos, tais como camundongos ou seres humanos e/ou podem ser camelizadas por meio de substituições de aminoácidos, conforme descrito na técnica. Em outra realização, as seqüências de VHH podem ser fundidas para gerar unidades multiméricas de duas, três, quatro, cinco ou mais unidades de
10 VHH, opcionalmente ligadas por meio de molécula espaçadora. Em outra realização, várias seqüências de VHH podem ser combinadas, separadamente ou em uma molécula multimérica. Preferencialmente, as seqüências de VHH possuem especificidades diferentes; seqüências de VHH podem ser combinadas, por exemplo, para gerar amplo espectro de afinidades para
15 patógeno específico. Em realização altamente preferida, duas, três, quatro, cinco ou mais seqüências de VHH que possuem afinidade para qualquer das linhagens de rotavírus Wa, CK5, Wa1, RRV ou CK5 podem ser combinadas, na forma de unidades monoméricas separadas ou como unidades combinadas sobre veículo, tal como sobre bactéria probiótica e/ou sobre molécula
20 multimérica.

Além disso, concluiu-se inesperadamente que anticorpos de cadeia pesada de lhama são apropriados para administração no trato gastrointestinal. Revelou-se que anticorpos de cadeia pesada de lhama são altamente resistentes à degradação de protease no estômago e suportam o
25 ambiente ácido do estômago. Isso ocorre apesar do fato de que o sistema proteolítico no trato gastrointestinal é ambiente mais agressivo que, por exemplo, o encontrado na boca. A atividade no intestino é prejudicada pela atividade proteolítica, que inclui protease e peptidase. Revelamos agora que,

ainda mais surpreendentemente, a liberação ou produção *in vivo* de fragmentos de anticorpos localmente no trato gastrointestinal soluciona o problema prático de degradação de anticorpos administrados oralmente no estômago e no intestino. A presente invenção é o primeiro sistema que permite a expressão de anticorpos no trato gastrointestinal que são adequados para administração de infecção por rotavírus.

Ao selecionar-se microorganismos probióticos como sistema de fornecimento, revelamos que estes microorganismos transformados expressarão anticorpos de cadeia pesada de lhama ou seus fragmentos sobre a sua superfície e são capazes de reduzir a carga viral, normalizar a patologia e reduzir a diarreia em modelo animal de infecção por rotavírus.

Os anticorpos de cadeia pesada de lhama são expressos em seguida pelo microorganismo no trato gastrointestinal. A expressão do fragmento de anticorpo VHH derivado de lhama pode ser sobre a superfície do microorganismo e/ou na forma de proteína secretada do microorganismo. Formas preferencialmente secretadas do fragmento de anticorpo VHH encontram-se em forma multimérica para aumentar a agregação e a liberação da carga viral.

Preferencialmente, o microorganismo ou, de maior preferência, bactéria probiótica é transformado com vetor de expressão que compreende o gene para o anticorpo de cadeia pesada de lhama ou seus fragmentos. O vetor de expressão pode conter promotor constitutivo a fim de expressar os anticorpos ou seus fragmentos. Esse promotor constitutivo sustentará a expressão *in situ* de anticorpos por lactobacilos transformados que persistem (ao menos por curto período) no trato intestinal após a administração. Alternativamente, o promotor pode ser selecionado como sendo ativo apenas no trato gastrointestinal e/ou no estômago/intestino, ou seja, apropriado somente para expressão específica no trato gastrointestinal. Isso garantirá a

expressão e/ou secreção do anticorpo de cadeia pesada de lhama ou seus fragmentos no trato gastrointestinal, preferencialmente no intestino. Muitos promotores constitutivos para lactobacilos são conhecidos na técnica e exemplo de promotor que é especificamente indutível no trato gastrointestinal é

5 Pldh (Pouwels et al, *Lactobacilli as Vehicles for Targeting Antigens to Mucosal Tissues by Surface Exposition of Foreign Antigens, Methods in Enzymology* (2001) 336: 369-389).

Os vetores de expressão descritos nos exemplos são capazes de reproduzir-se nos lactobacilos transformados e expressar os anticorpos ou

10 seus fragmentos. Compreender-se-á que a presente invenção não se limita apenas a estes vetores de expressão de reprodução. O conjunto de expressão completo pode ser inserido em chamado plasmídeo de "integração", por meio do quê o conjunto de expressão será integrado ao cromossomo dos lactobacilos após a transformação, conforme conhecido na técnica (Pouwels,

15 P. H. e Chaillou, S., *Gene Expression in Lactobacilli* (2003), *Genetics of Lactic Acid Bacteria*, págs. 143-188).

II. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS INDEPENDENTES DOS ANTICORPOS OU

FRAGMENTOS DE ANTICORPOS.

O produto alimentício ou preparação farmacêutica de acordo com

20 a presente invenção compreende adicionalmente microorganismo probiótico que é independente dos anticorpos ou seus fragmentos.

O microorganismo probiótico pode ser utilizado em condição viável ou inviável, conforme o desejado. Caso os microorganismos devam ser utilizados em estado inviável, eles podem ser tornados inviáveis por quaisquer

25 meios apropriados.

O microorganismo probiótico pode ser qualquer bactéria probiótica comestível apropriada, fungo ou levedura e, particularmente, pode ser de qualquer dos tipos, incluindo os tipos preferidos, relacionados acima

para o microorganismo que faz parte de qualquer sistema de fornecimento para os anticorpos ou seus fragmentos. Bactéria probiótica particularmente preferida para uso como "microorganismo probiótico independente" é *Lactobacillus reuterii*.

5 Convenientemente, a quantidade do microorganismo no sistema de fornecimento em produtos alimentícios de acordo com a presente invenção é de 10^6 a 10^{11} por porção ou (por exemplo, caso o tamanho da porção não seja conhecido) de 10^6 a 10^{11} por cem gramas de produto, de maior preferência estes níveis são de 10^8 a 10^9 por porção ou por cem gramas de produto. Em
10 algumas circunstâncias, é conveniente que a quantidade total de microorganismo no produto alimentício (ou seja, o total da quantidade do microorganismo no sistema de fornecimento e a quantidade do microorganismo probiótico que é independente dos anticorpos ou seus fragmentos) seja de 10^6 a 10^{11} por porção ou (por exemplo, caso o tamanho da porção não seja
15 conhecido) de 10^6 a 10^{11} por cem gramas de produto, de maior preferência estes níveis são de 10^8 a 10^9 por porção ou por cem gramas de produto.

O microorganismo probiótico pode ser adicionado por qualquer meio apropriado ao produto alimentício ou preparação farmacêutica.

PRODUTOS ALIMENTÍCIOS:

20 Vários produtos alimentícios podem ser preparados de acordo com a presente invenção, tais como substituintes de refeições, sopas, macarrões, sorvete, molhos, coberturas, espalhantes, lanches, cereais, bebidas, pão, biscoitos, outros produtos de padaria, doces, barras, chocolate, chicles, produtos lácteos, produtos dietéticos tais como produtos para
25 emagrecimento ou substituintes de refeições etc. Para algumas aplicações, os produtos alimentícios de acordo com a presente invenção podem também ser suplementos alimentícios, embora a aplicação em produtos alimentícios do tipo acima seja preferida.

Em todas as aplicações, os microorganismos transformados podem ser adicionados na forma de biomassa (úmida) cultivada viável ou como preparação seca, que ainda contém microorganismos viáveis conforme conhecido na técnica.

- 5 A Tabela 1 indica uma série de produtos, que podem ser preparados de acordo com a presente invenção, e tamanho típico de porção.

TABELA 1

Produto	Tamanho da amostra
Margarina	15 g
Sorvete	150 g
Cobertura	30 g
Doce	10 g
Barra	75 g
Bebida substituinte de refeição	330 ml
Bebidas	200 ml

- Meio alternativo de administração dos anticorpos ou seus fragmentos (incluindo sistema de fornecimento que compreende microorganismo transformado com anticorpos ou seus fragmentos funcionais) e os microorganismos probióticos compreende implemento de liberação para uso com produto alimentício que compreende microorganismos probióticos, implemento este que é revestido sobre pelo menos uma superfície com anticorpos ou fragmentos de anticorpos que sejam ativos no intestino. Prefere-se que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos compreendam sistema de fornecimento para fornecer os anticorpos ou fragmentos de anticorpos para o trato gastrointestinal.

- Ainda outro meio alternativo de administração dos anticorpos ou seus fragmentos e dos microorganismos probióticos compreende implemento de liberação para uso com produto alimentício, em que o implemento de

liberação é revestido sobre pelo menos uma superfície com anticorpos ou fragmentos de anticorpos que sejam ativos no intestino e microorganismos probióticos. Prefere-se que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos compreendam sistema de fornecimento para fornecer os anticorpos ou
5 fragmentos de anticorpos para o trato gastrointestinal.

Para os dois meios alternativos de administração acima, prefere-se que o sistema de fornecimento compreenda anticorpos encapsulados ou fragmentos de anticorpos e/ou que o sistema de fornecimento compreenda microorganismo transformado para que seja capaz de produzir anticorpos ou
10 seus fragmentos.

A expressão implemento de liberação cobre tubo, canudos, facas, garfos, colheres, bastões ou outros implementos que são utilizados para fornecer produto alimentício líquido ou semi-sólido para consumidor. O implemento de liberação pode também ser utilizado para fornecer produto
15 alimentício sólido para consumidor. Este tubo ou canudo de liberação é especialmente apropriado para uso com certas bebidas em que baixo ou alto pH e/ou temperatura indica que a adição direta do microorganismo à bebida não é recomendada.

O implemento de liberação pode também ser utilizado quando o
20 sistema de fornecimento de acordo com a presente invenção compreender anticorpos encapsulados ou seus fragmentos ou mesmo com os próprios anticorpos ou seus fragmentos.

Após o revestimento do implemento de liberação com os componentes relevantes de acordo com o acima, o implemento é armazenado
25 em envelope externo que é impermeável à umidade e outra contaminação. O material de revestimento que contém estas partículas é atóxico para seres humanos e bactérias e pode ser óleo tal como óleo de milho ou cera. Este aspecto é descrito em US 6.283.294 B1. Após a penetração do implemento de

liberação que contém estes componentes na bebida ou produto alimentício semi-sólido, as partículas são integradas ao produto alimentício, gerando dose desejável dos anticorpos ou seus fragmentos e dos microorganismos probióticos com porção do produto.

5 Preferencialmente, os componentes acima a serem revestidos sobre o implemento podem ser suspensos em água, que é aplicada em seguida ao implemento de liberação e evaporada. Utilizando este método, o implemento de liberação possuirá revestimento dos componentes que pode ser liberado quando o implemento de liberação entrar em contato com o produto
10 alimentício semi-sólido ou líquido.

Ainda outra realização da presente invenção refere-se a método de fabricação de produto alimentício ou preparação farmacêutica de acordo com o quarto aspecto da presente invenção.

Caso se deseje que o microorganismo e/ou o microorganismo
15 probiótico esteja(m) vivo(s) no produto, tal como se o produto for aquecido durante o processamento, o microorganismo necessita ser adicionado após a etapa de aquecimento (após a dosagem). Entretanto, caso produto seja fermentado com o microorganismo, etapa de aquecimento após a fermentação pode não ser aceitável. Caso o produto seja produto líquido, a administração
20 do microorganismo poderá ter lugar utilizando implemento de liberação tal como canudo para beber.

Realização adicional da presente invenção refere-se ao uso do produto alimentício ou preparação farmacêutica de acordo com a presente invenção para fornecer benefícios à saúde do intestino de paciente após a
25 administração. Esses benefícios à saúde incluem o benefício à saúde específico que o anticorpo pode fornecer. O próprio microorganismo utilizado em qualquer sistema de fornecimento pode também fornecer vários efeitos à saúde, tais como relativos ao bem estar intestinal como IBS (Síndrome

Intestinal Irritável), redução da má digestão de lactose, sintomas clínicos de diarreia, modulação imunológica, atividade antitumores, efeitos adjuvantes e aumento da absorção de minerais.

O produto alimentício ou preparação farmacêutica de acordo com a presente invenção pode ser apropriado para administração, incluindo tratamento ou profilaxia de infecções causadas por bactérias enteropatogênicas ou vírus. Outros anticorpos que podem ser incorporados à presente invenção serão capazes de fornecer uma série de outros benefícios à saúde.

A presente invenção baseia-se na revelação de que imunoglobulinas de cadeia pesada ou seus fragmentos do tipo VHH ou VNAR, ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos, de acordo com a presente invenção, podem ser utilizadas na terapia ou profilaxia de infecções por microorganismos enteropatogênicos. Além disso, as imunoglobulinas ou seus fragmentos do tipo VHH ou VNAR, ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos, podem ser utilizadas na terapia ou profilaxia de gastroenterite viral ou diarreia causada pelo microorganismo enteropatogênico rotavírus.

Vantagem adicional da presente invenção é que o uso de produtos alimentícios ou preparações farmacêuticas que compreendem microorganismos probióticos que expressam imunoglobulinas ou seus fragmentos do tipo VHH ou VNAR, ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos, permite que o microorganismo utilizado como parte de qualquer sistema de fornecimento, tal como *Lactobacillus*, forneça os benefícios normais à saúde a ele associados, junto com os benefícios profiláticos/terapêuticos na administração da infecção a ser tratada. Esta terapia de “efeito duplo” fornece benefícios à saúde maiores para o paciente que o conhecido na técnica.

Segundo outra realização da presente invenção, as

imunoglobulinas de cadeia pesada ou seus fragmentos do tipo VHH são derivadas de camelídeos, incluindo lhamas e camelos. Muitos fragmentos de anticorpos de cadeia pesada derivados de lhamas foram descritos na técnica. É de maior preferência a imunoglobulina de cadeia pesada ou seu fragmento que
5 exibe afinidade de união com constante de dissociação de pelo menos 10^5 para rotavírus, especialmente as linhagens de rotavírus Wa, CK5, Wa1, RRV ou CK5.

Revelamos, surpreendentemente, que anticorpos de cadeia pesada de lhama são eficazes na administração de infecções por rotavírus. Quando os anticorpos utilizados forem anticorpos de cadeia pesada de lhama,
10 o benefício à saúde fornecido incluirá efeito antidiarréico. Desta forma, anticorpos de cadeia pesada de lhama podem ser utilizados na administração de infecções por rotavírus, incluindo a terapia ou profilaxia de infecções por rotavírus. Revelamos que fragmentos de anticorpos de VHH de lhama podem reduzir a carga viral, normalizar a patologia e reduzir a diarreia durante
15 infecções por rotavírus. Rotavírus permanece sendo a causa isolada mais comum de diarreia infantil no mundo e a maior parte das crianças fica infectada durante os cinco primeiros anos de vida. Em países em desenvolvimento, diarreia induzida por rotavírus pode causar de 600.000 a 870.000 mortes por ano e, em países desenvolvidos, doença de rotavírus representa imensos
20 prejuízos econômicos.

Além disso, também se concluiu inesperadamente que anticorpos de cadeia pesada de lhama são apropriados para administração no intestino. Revelamos surpreendentemente que os anticorpos de cadeia pesada de lhama são altamente resistentes à degradação de protease no estômago e suportam
25 o ambiente ácido do estômago. Isso ocorre apesar do fato de que o sistema proteolítico no intestino/estômago é ambiente mais agressivo que, por exemplo, o encontrado na boca. A produção *in vivo* de fragmentos de anticorpos localmente no trato gastrointestinal soluciona o problema prático de

degradação de anticorpos administrados por via oral no estômago. A presente invenção é o primeiro sistema que permite a expressão de anticorpos no trato gastrointestinal que sejam apropriados para administração de infecções por rotavírus.

5 Desta forma, o uso de produtos alimentícios ou preparações farmacêuticas que compreendem lactobacilos que expressam anticorpos de cadeia pesada de lhama permite que os lactobacilos utilizados como parte de qualquer sistema de fornecimento proporcionem os benefícios à saúde normais a eles associados, junto com os benefícios profiláticos/terapêuticos na
10 administração de infecções por rotavírus. A presente invenção é o primeiro sistema que permite a expressão de anticorpos no trato gastrointestinal que são apropriados para administração de infecções por rotavírus.

 Compreender-se-á que o produto alimentício ou preparação farmacêutica pode ser administrado a fim de fornecer benefício à saúde do
15 paciente e/ou combater doença ou infecção específica. A seleção do anticorpo dependerá da doença a ser tratada.

 Preferencialmente, o microorganismo é transformado com vetor de expressão que compreende o gene para o anticorpo de cadeia pesada de lhama ou seu fragmento. Pode-se utilizar vetor de integração ou de
20 reprodução.

 Caso a encapsulação seja selecionada como sistema de fornecimento, o método de encapsulação deverá sobreviver à passagem para o estômago através do trato gastrointestinal e deverá ser capaz de fornecer liberação sustentada do anticorpo ao longo de período de tempo estabelecido.
25 Isso garantirá que o anticorpo de cadeia pesada de lhama ou seu fragmento seja fornecido ao longo do tempo para o estômago. Anticorpos de cadeia pesada de lhama ou suas cadeias pesadas são particularmente apropriados para este método de encapsulação devido à sua capacidade de sobrevivência

no intestino quando liberados.

Especificamente, os anticorpos que fazem parte de qualquer sistema de fornecimento podem ser fornecidos ao trato gastrointestinal utilizando microorganismo transformado com anticorpos de cadeia pesada de lhama, que compreende as etapas de i) transformação do microorganismo com o gene que codifica anticorpos de cadeia pesada de lhama; e ii) administração do microorganismo transformado ao trato gastrointestinal do ser humano ou animal necessitado de terapia.

A presente invenção será agora adicionalmente ilustrada pela descrição de realizações apropriadas dos produtos alimentícios preferidos para uso na presente invenção. Acredita-se que esteja dentro da capacidade dos técnicos no assunto o uso dos ensinamentos fornecidos para a preparação de outros produtos de acordo com a presente invenção.

MARGARINAS E OUTROS ESPALHANTES:

Tipicamente, estas são emulsões de óleo em água ou água em óleo e também são cobertos espalhantes que são substancialmente livres de gordura. Tipicamente, estes produtos são espalháveis e não despejáveis à temperatura de uso, tal como 2 a 10 °C. Os níveis de gordura podem variar em ampla faixa, tais como margarinas com gordura plena com 60 a 90% em peso de gordura, margarinas com gordura média com 30 a 60% em peso de gordura, produtos com baixa gordura com 10 a 30% em peso de gordura e margarinas com gordura muito baixa ou livres de gordura com 0 a 10% em peso de gordura.

A gordura na margarina ou outro espalhante pode ser qualquer gordura comestível e são freqüentemente utilizados óleo de soja, óleo de colza, óleo de girassol e óleo de palma. Gorduras podem ser utilizadas como tal ou em forma modificada, tais como hidrogenadas, esterificadas, refinadas etc. Outros óleos apropriados são bem conhecidos na técnica e podem ser

selecionados conforme o desejado.

O pH de margarina ou espalhante pode convenientemente ser de 4,5 a 6,5.

Exemplos de espalhantes diferentes de margarinas são
5 espalhantes de queijo, espalhantes doces, espalhantes de iogurte etc.

Ingredientes adicionais opcionais de espalhantes podem ser emulsificantes, corantes, vitaminas, conservantes, emulsificantes, gomas, espessantes etc. O saldo do produto normalmente será de água.

Tamanho típico de porção média de margarina ou outros
10 espalhantes é de quinze gramas. *Lactobacillus* produtores de VHH preferidos na margarina ou espalhante são de 10^6 e 10^{11} por porção, de maior preferência 10^8 a 10^{10} por porção. A linhagem de *Lactobacillus* necessita ser adicionada assepticamente após as etapas de aquecimento no processo. Alternativamente, VHHs encapsulados podem ser adicionados a esses
15 produtos alimentícios. Preferencialmente, são adicionados 25 a 5000 μg por porção, de maior preferência de 50 a 500 μg são adicionados por porção. De preferência superior, duas ou três porções são servidas por dia.

PRODUTOS DE CONFEITARIA CONGELADOS:

Para os propósitos da presente invenção, a expressão produto de
20 confeitaria congelado inclui leite que contém confeitos congelados, tal como sorvete, iogurte congelado, sorvete de frutas, picolé, leite congelado e pudim congelado, gelos de água, granitas e purês de fruta congelados.

Preferencialmente, o nível de sólidos no confeito congelado (tal como açúcar, gordura, aromatizante etc.) é de mais de 3% em peso, de maior
25 preferência de 10 a 70% em peso, tal como de 40 a 70% em peso.

Sorvete compreenderá tipicamente de 2 a 20% em peso de gordura, 0 a 20% em peso de adoçantes, 2 a 20% em peso de componentes de leite sem gordura e componentes opcionais tais como emulsificantes,

estabilizantes, conservantes, ingredientes aromatizantes, vitaminas, sais minerais etc., em que o saldo é água. Tipicamente, o sorvete será aerado, tal como até sobrecondução de 20 a 400%, de forma mais geral de 40 a 200%, e congelado até temperatura de -2 a -200 °C, de forma mais geral de -10 a -30 °C.

5 Sorvete normalmente compreende cálcio em nível de cerca de 0,1% em peso.

Tamanho típico de porção média de material de confeitaria congelado é de 150 gramas. Os níveis de *Lactobacillus* preferidos são de 10^6 a 10^{11} por porção, de maior preferência estes níveis são de 10^7 a 10^{10} por porção, de preferência superior de 10^8 a 10^9 por porção. A linhagem de *Lactobacillus* necessita ser adicionada assepticamente após as etapas de aquecimento no processo. Alternativamente, VHHs encapsulados podem ser adicionados a estes produtos alimentícios. Preferencialmente, adiciona-se de 25 a 5000 µg por porção, de maior preferência de 50 a 500 µg são adicionados por porção. De preferência superior, duas ou três porções são fornecidas por dia.

15 BEBIDAS, TAIS COMO PRODUTOS COM BASE EM CHÁ OU SUBSTITUINTES DE

ALIMENTOS:

Lactobacillus podem ser convenientemente utilizados para bebidas tais como suco de frutas, refrigerantes etc. Bebida muito vantajosa de acordo com a presente invenção é produto com base em chá ou bebida substituinte de refeição. Estes produtos serão descritos com mais detalhes abaixo. Será evidente que níveis e composições similares aplicam-se a outras bebidas que compreendem bactérias de *Lactobacillus* e vitaminas.

Para os propósitos da presente invenção, a expressão produtos com base em chá designa produtos que contêm chá ou composições de ervas que substituem chá, tais como sacos de chá, folhas de chá, sacos de chá de ervas, infusões de ervas, chá em pó, chá de ervas em pó, chá gelado, chá de ervas gelado, chá gelado carbonatado, infusão de ervas carbonatada etc.

Tipicamente, alguns produtos com base em chá de acordo com a

presente invenção podem necessitar de etapa de preparação pouco antes do consumo, tal como a elaboração de chá a partir de sacos de chá, folhas de chá, sacos de chá de ervas ou infusões de ervas ou a solubilização de chá em pó ou chá de ervas em pó. Para estes produtos, prefere-se ajustar o nível de *Lactobacillus* no produto, de tal forma que uma porção do produto final a ser consumido contenha os níveis desejados de *Lactobacillus* conforme descrito acima.

Para chá gelado, chá de ervas gelado, chá gelado carbonatado e infusões de ervas carbonatadas, o tamanho típico de uma porção será de 200 ml ou 200 gramas.

Bebidas substituintes de refeições baseiam-se tipicamente em base líquida que pode ser espessada, por exemplo, por meio de gomas ou fibras e às quais adiciona-se coquetel de minerais e vitaminas. A bebida pode ser aromatizada no sabor desejado, tal como sabor de frutas ou de chocolate. Tamanho de porção típico pode ser de 330 ml ou 330 gramas.

Para bebidas com base em chá e para bebidas substituintes de alimentos, os níveis de *Lactobacillus* preferidos são de 10^6 a 10^{11} por porção, de maior preferência estes níveis são de 10^7 a 10^{10} por porção, de maior preferência de 10^8 a 10^9 por porção. Alternativamente, VHHs encapsulados podem ser adicionados a estes produtos alimentícios. Preferencialmente, são adicionados de 25 a 5000 μg por porção, de maior preferência são adicionados de 50 a 500 μg por porção. De preferência superior, duas ou três porções são fornecidas por dia.

Para produtos que são extraídos para a obtenção do produto final, geralmente o propósito é garantir que uma porção de 200 ml ou 200 gramas compreenda as quantidades desejadas conforme indicado acima. Neste contexto, dever-se-á apreciar que normalmente apenas parte do *Lactobacillus* presente no produto com base em chá a ser extraído será eventualmente

extraído para a bebida de chá final. Para compensar este efeito, geralmente é desejável incorporar aos produtos a serem extraídos cerca de duas vezes a quantidade que se deseja ter no extrato.

Para folhas de chá ou sacos de chá, tipicamente seriam utilizados
5 um a cinco gramas de chá para preparar uma única porção de 200 ml.

Caso sejam utilizados sacos de chá, o *Lactobacillus* pode ser convenientemente incorporado ao componente de chá. Apreciar-se-á, entretanto, que, para algumas aplicações, pode ser conveniente separar o *Lactobacillus* do chá, tal como por meio da sua incorporação a compartimento
10 separado do saco de chá ou sua aplicação sobre o papel de saco de chá. Alternativamente, o microorganismo pode ser administrado em forma seca utilizando canudo, colher ou bastão com revestimento de microorganismo seco.

COBERTURAS DE SALADA OU MAIONESE:

Geralmente, coberturas ou maionese são emulsões de óleo em
15 água, em que a fase de óleo da emulsão é geralmente de 0 a 80% em peso do produto. Para produtos sem redução de gordura, o nível de gordura é tipicamente de 60 a 80%, para coberturas de salada o nível de gordura é geralmente de 10 a 60% em peso, de maior preferência de 15 a 40% em peso, e coberturas com baixa ou nenhuma gordura podem conter, por exemplo,
20 níveis de triglicérides de 0, 5, 10 e 15% em peso.

Coberturas e maionese são geralmente produtos com baixo pH que possuem pH preferido de 2 a 6.

Coberturas ou maionese podem conter opcionalmente outros ingredientes tais como emulsificantes (por exemplo, gema de ovo), estabilizantes,
25 acidulantes, biopolímeros, agentes formadores de volume, aromas, agentes corantes etc. O saldo da composição é água, que poderá estar convenientemente presente em nível de 0,1 a 99,9% em peso, mais geralmente de 20 a 99% em peso, de preferência superior de 50 a 98% em peso.

Tamanho típico de porção média de coberturas ou maionese é de trinta gramas. Os níveis preferidos de *Lactobacillus* nesses produtos seriam de 10^6 a 10^{11} por porção, de maior preferência estes níveis são de 10^7 a 10^{10} por porção, de preferência superior de 10^8 a 10^9 por porção. A linhagem de *Lactobacillus* necessita ser adicionada assepticamente após as etapas de aquecimento no processo. Alternativamente, VHHs encapsulados podem ser adicionados a esses produtos alimentícios. Preferencialmente, são adicionados de 25 a 5000 μg por porção, de maior preferência de 50 a 500 μg são adicionados por porção. De preferência superior, são fornecidas duas ou três porções por dia.

BARRAS OU LANCHES SUBSTITUINTES DE REFEIÇÕES:

Estes produtos freqüentemente compreendem matriz de material comestível em que o *Lactobacillus* pode ser incorporado. A matriz pode ser, por exemplo, com base em gordura (tal como cobertura ou chocolate) ou pode ser baseada em produtos de confeitaria (pão, roscas, biscoitos etc.), ou pode ser baseada em partículas aglomeradas (arroz, grãos, nozes, passas, partículas de frutas).

Tamanho típico de lanche ou barra de substituição de refeições poderá ser de 20 a 200 g, geralmente de 40 a 100 g. Os níveis preferidos de *Lactobacillus* nestes produtos seriam de 10^6 a 10^{11} por porção, de maior preferência estes níveis são de 10^7 a 10^{10} por porção, de preferência superior de 10^8 a 10^{10} por porção. A linhagem de *Lactobacillus* necessita ser adicionada assepticamente após as etapas de aquecimento no processo. Alternativamente, VHHs encapsulados podem ser adicionados a esses produtos alimentícios. Preferencialmente, são adicionados de 25 a 5000 μg por porção, de maior preferência de 50 a 500 μg são adicionados por porção. De preferência superior, duas ou três porções são fornecidas por dia.

Podem ser agregados ingredientes adicionais ao produto acima, tais como materiais aromatizantes, vitaminas, sais minerais etc.

Para cada um dos produtos alimentícios acima, a quantidade de *Lactobacillus* por porção foi fornecida como exemplo preferido. Compreender-se-á que alternativamente qualquer microorganismo apropriado ou vírus pode estar presente neste nível.

LIMONADA EM PÓ:

Lactobacillus podem também ser utilizados em pós secos em sachês, a serem dissolvidos instantaneamente em água para gerar limonada refrescante. Este pó pode possuir veículo com base em alimento, tal como maltodextrina ou qualquer outro. Ingredientes adicionais opcionais podem ser corantes, vitaminas, sais minerais, conservantes, gomas, espessantes etc.

Tamanho típico para porção média, margarina ou outros espalhantes é de trinta a cinquenta gramas. *Lactobacillus* produtores de VHH preferidos na limonada em pó são de 10^6 a 10^{11} por porção, de maior preferência de 10^8 a 10^{10} por porção. A linhagem de *Lactobacillus* necessita ser pulverizada sobre o veículo de forma a ser mantida viva, de acordo com métodos conhecidos dos técnicos no assunto. Alternativamente, VHHs encapsulados podem ser adicionados a esses produtos alimentícios. Preferencialmente, são adicionados de 25 a 5000 μg por porção, de maior preferência de 50 a 500 μg são adicionados por porção.

Em todos os produtos acima, o microorganismo transformado pode ser adicionado na forma de biomassa cultivada viável (úmida) ou de preparação seca, que ainda contém os microorganismos viáveis conforme conhecido na técnica.

A presente invenção será adicionalmente ilustrada nos exemplos.

EXEMPLOSEXEMPLOS 1 A 3: GERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS COM TESTE *IN VITRO* E *IN VIVO* SUBSEQÜENTEEXEMPLO 1

5 SELEÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DE CADEIA PESADA ESPECÍFICOS DE
ROTAVÍRUS DE BIBLIOTECA DE EXIBIÇÃO DE FAGOS IMUNES DE LHAMA E PRODUÇÃO
EM LEVEDURA

RRV de linhagem de rotavírus de Rhesus (sorotipo G3) foi purificado, amplificado e concentrado conforme descrito anteriormente
 10 (Svensson, L., Finlay, B. B., Bass, D., Vonbonsdorff, C. H., Greenberg, H. B., *Symmetrical Infection on Polarised Human Intestinal Epithelial (CaCo-2) Cells*, *J. Virol.* (1991) 65, 4190-4197.

Lhama foi imunizada por via subcutânea e intramuscular no dia 0, 42, 63, 97 e 153 com 5×10^{12} pfu de rotavírus linhagem RRV.

15 Antes da imunização, as partículas virais foram absorvidas em emulsão em óleo (1:9 V/V, antígeno em PBS: Specol (Bokhout, B. A., Van Gaalen, C. e Van Der Heijden, Ph. J., *A Selected Water-in-Oil Emulsion: Composition and Usefulness as an Immunological Adjuvant*, *Vet. Immunol. Immunopath.* (1981) 2: 491-500 e Bokhout, B. A., Bianchi, A. T. J., Van Der
 20 Heijden, Ph. J., Scholten, J. W. e Stok, W., *The Influence of a Water-in-Oil Emulsion on Humoral Immunity*, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* (1986) 9: 161-168, conforme descrito acima (Frenken, L. G. J. et al, *Isolation of Antigen Specific Llama V_{HH} Antibody Fragments and their High Level Secretion by *Saccharomyces cerevisiae**, *J. Biotechnol.* (2000) 78, 11-21). A reação
 25 imunológica foi seguida por titulação de amostras de soro em ELISA com rotavírus RRV revestido em título de 4×10^6 pfu/ml em 0,9% NaCl seguindo o protocolo descrito acima (De Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W. e

Hoogenboom, H. R., *A Large Non-Immunized Human Fab Fragment Phage Library that Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies*, *J. Biol. Chem.* (1999) 274: 18218-18230; Frenken, L. G. J. et al, *Isolation of Antigen Specific Llama V_{HH} Antibody Fragments and their High*
 5 *Level Secretion by Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.* (2000) 78, 11-21).

População de linfócitos enriquecida foi obtida a partir da amostra de sangue de 153 dias de cerca de 150 ml por meio de centrifugação sobre gradiente descontínuo Ficoll (Pharmacia). A partir destas células, o RNA total (250 a 400 µg) foi isolado por meio de extração com tiocianato de guanídio
 10 ácido, Chomczynski, P. e Sacchi, N., *Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*, *Anal. Biochem.* (1987) 162: 156-159. Em seguida, cDNA de primeira fita foi sintetizado utilizando o kit de cDNA de primeira fita Amersham (RPN 1266). Em mistura de reação de 20 µl, utilizou-se 0,4 a 1 µg de RNA. O primer aleatório 6-mer foi
 15 utilizado para servir de primer para a primeira fita de DNA. Após a síntese de cDNA, a mistura de reação foi utilizada diretamente para amplificação por meio de PCR. Genes VHH foram amplificados com os primers:

Lam-16: (GAGGTBCARCTGCAGGASAGYGG);

Lam-17: (GAGGTBCARCTGCAGGASTCYGG);

20 Lam-07: (primer até a região de articulação curta); e

Lam-08: (específico de articulação longa).

(Frenken, L. G. J. et al, *Isolation of Antigen Specific Llama V_{HH} Antibody Fragments and their High Level Secretion by Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.* (2000) 78, 11-21). Realizou-se amplificação de DNA
 25 conforme descrito por De Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W. e Hoogenboom, H. R., *A Large Non-Immunized Human Fab Fragment Phage Library that Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies*, *J. Biol.*

Chem. (1999) 274: 18218-18230.

Os produtos amplificados foram digeridos com *Pst*I e *Not*I (New England Biolabs, Estados Unidos) e clonados em vetor de fagomídeo pUR5071, que é baseado em pHEN1 (Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P. e Winter, G., *Multi-Subunit Proteins on the Surface of Filamentous Phage: Methodologies for Displaying Antibody (Fab) Heavy and Light Chains*, *Nucleic Acids Res.* (1991) 19: 4133-4137) e contém cauda de hexahistidina para Cromatografia de Afinidade Imobilizada (Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. e Stüber, D., *Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent*, *Bio/Technol.* (1988) 6: 1321-1325) e marca derivada de c-myc (Munro, S. e Pelham, H. R., *An Hsp70-like Protein in the ER: Identity with the 78 kd Glucose-Regulated Protein and Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein*, *Cell* (1986) 46: 291-300) para detecção. Ligação e transformação foram realizadas conforme descrito anteriormente (De Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W. e Hoogenboom, H. R., *A Large Non-Immunized Human Fab Fragment Phage Library that Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies*, *J. Biol. Chem.* (1999), 274: 18218-18230). O resgate com fago auxiliar VCS-M13 e precipitação de PEG foi realizado conforme descrito por Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. e Winter, G., *By-Passing Immunization: Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage*, *J. Mol. Biol.* (1991), 222: 581-597.

Seleções de fagos específicos de rotavírus foram realizadas por meio do método de biomistura (Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. e Winter, G., *By-Passing Immunization: Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage*, *J. Mol. Biol.* (1991), 222: 581-597) por meio de revestimento de RRV de linhagem de

rotavírus ($2,5 \times 10^7$ pfu/ml na rodada 1; 5×10^4 pfu/ml na rodada 2; 500 pfu/ml na rodada 3). Imunotubos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram revestidos por uma noite a 4 °C com diluição 1:1000 de soro de coelho anti-rotavírus ou soro de cobaias anti-rotavírus em tampão de carbonato (16% (v/v) 0,2 M NaHCO_3 + 9% (v/v) 0,2 M Na_2CO_3). Partículas virais foram capturadas por meio de soro anti-rotavírus policlonal. Além das seleções padrão, o fragmento de anticorpo que exhibe fagos foi selecionado em ambiente ácido. Isso foi realizado por meio de seleção em solução de HCl diluída (pH 2,3). Após este processo de seleção adaptado, foi seguido o procedimento padrão.

- 10 VHH solúvel foi produzido por clones TG1 de *E. coli* conforme descrito por Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. e Winter, G., *By-Passing Immunization: Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage*, *J. Mol. Biol.* (1991) 222: 581-597. Sobrenadantes de cultivo foram testados em ELISA. Placas Microlon F (Greiner Bio-One GmbH, Alemanha) foram revestidas com 50 µl/cavidade de diluição 1:1000 de soro policlonal de coelho anti-rotavírus ou soro policlonal de cobaia anti-rotavírus em tampão de carbonato (16% (v/v) 0,2 M NaHCO_3 + 9% (v/v) 0,2 M Na_2CO_3) e incubadas em seguida com rotavírus linhagem RRV ou CK5 (cerca de 10^9 pfu/ml). Após a incubação dos sobrenadantes que contêm VHH, 20 VHHs foram detectados com mistura do anticorpo monoclonal anti-myc de camundongo 9E10 (500 ng/ml, produção doméstica) e conjugado de HRP anti-camundongo (250 ng/ml, Dako, Dinamarca). Alternativamente, realizou-se detecção com conjugado anti-6xHis-anticorpo HRP (1000 ng/ml, Roche Molecular, Estados Unidos). Análise de impressão digital (Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. e Winter, G., 25 *By-Passing Immunization: Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage*, *J. Mol. Biol.* (1991) 222: 581-597) com a enzima de restrição *HinFI* (New England Biolabs, Estados Unidos) foi realizada em todos os clones.

Realizou-se seqüenciamento na Baseclear B. V. (Leiden, Países Baixos).

Foi selecionado conjunto de fragmentos de anticorpos específicos de rotavírus. Seqüências de DNA que codificam estes fragmentos de anticorpos foram isoladas a partir de pUR5071 (*Pst*II/*Bst*EII, New England Biolabs, Estados Unidos) e clonadas em pUR4547 que é idêntico ao pUR4548 descrito anteriormente (Frenken, L. G. J. et al, *Isolation of Antigen Specific Llama V_{HH} Antibody Fragments and their High Level Secretion by Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.* (2000) 78, 11-21), mas não codifica nenhuma seqüência de marca C-terminal. Este vetor de expressão de levedura episomal contém o promotor *GAL7*, a seqüência de sinal *SUC2* para expressão em alto nível e secreção no meio de crescimento, respectivamente. A linhagem VWK18gal1 de *S. cerevisiae* foi transformada e induzida para produção de fragmentos de anticorpos conforme descrito anteriormente (Van der Vaart, J. M., *Expression of VHH Antibody Fragments in Saccharomyces cerevisiae*. Em *Methods in Molecular Biology* (2001), vol. 178, págs. 359-366, editado por P. M. O'Brien e R. Aiken, Humana Press Inc., Totowa NJ). Fragmentos de anticorpos foram purificados e concentrados por meio de filtração sobre filtros microcon com corte de 10 kDa (Amicon, Estados Unidos).

EXEMPLO 2

INIBIÇÃO IN VITRO DE ROTAVÍRUS

Rotavírus bovino Compton CK5 foi obtido a partir do Instituto Moredun, Midlothian, Escócia, e as células BS-C1 foram adquiridas da Coleção Européia de Cultivo de Células Animais.

As células BS-C1 foram cultivadas em Meio Essencial Modificado de Earles suplementado com soro de feto de bezerro desativado por calor a 10%, solução de aminoácidos MEM a 1% (100X), 20 mmol l⁻¹ de L-glutamina, 100 UI ml⁻¹ de penicilina, 100 µg ml⁻¹ de estreptomicina e 2,5 µg ml⁻¹ de

anfotericina B (todos da Sigma, Estados Unidos).

Estoque de rotavírus CK5 foi diluído em Meio Livre de Soro (SFM) EMEM suplementado com 1% solução de aminoácidos MEM (100x), 20 mmol l⁻¹ de L-glutamina e 0,5 µg/ml de tripsina cristalina e, em seguida, adicionou-se 5 ml de sementes diluídas a monocamadas confluentes de células BS-C1 em frascos de cultivo de tecidos de 162 cm² (Costar, Reino Unido). O vírus foi adsorvido sobre as células por uma hora a 37 °C e, em seguida, o meio foi completado até 75 ml. As garrafas foram incubadas a 37 °C até observar-se efeito citopático completo. Cultivos foram congelados (-70 °C) e descongelados por duas vezes, depois reunidos e centrifugados a 1450 g por quinze minutos a 4 °C para remover fragmentos celulares. O sobrenadante foi decantado e armazenado em parcelas a -70 °C.

Monocamadas de células BS-C1 foram cultivadas em placas de cultivo de tecidos com doze cavidades a 37 °C em atmosfera de 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. O meio foi removido e substituído com SFM por pelo menos duas horas antes do uso. O vírus CK5 foi diluído para gerar cerca de 50 pfu/ml em SFM. Os fragmentos anti-rotavírus selecionados foram diluídos em SFM e, em seguida, volumes iguais de vírus e diluição de fragmentos foram misturados (volume total de 200 µl) e incubados por uma hora a 37 °C.

As misturas de vírus e fragmento foram colocadas em placas em seguida sobre as monocamadas de células (três cavidades iguais cada). As placas foram incubadas por uma hora a 37 °C em atmosfera de 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. Em seguida, o vírus foi removido e sobrecamada que consiste de 0,75% Agarose de Placa Marítima (FMC) em EMEM contendo 100 UI ml⁻¹ de penicilina, 100 µg ml⁻¹ de estreptomicina, 2,5 µg ml⁻¹ de anfotericina B e adicionou-se 0,1 µg/ml de tripsina cristalina. As placas foram incubadas em seguida a 37 °C em atmosfera de 95% de ar e 5% de dióxido de

carbono por quatro dias. Após fixação e manchas com violeta de cristal a 1% em formaldeído a 10%, a agarose foi removida, as cavidades foram lavadas com água e as placas foram contadas.

De 23 clones testados de acordo com o método descrito acima, nove produziram fragmentos de anticorpos capazes de neutralizar esta linhagem de rotavírus. Os fragmentos 2B10 e 1D3 neutralizaram mais eficientemente rotavírus nos testes de placas (Fig. 1).

A Figura 1 exibe neutralização de vírus de rotavírus CK5 determinada por teste de placas *in vitro*. A taxa média de neutralização das quatro medições obtidas é indicada em cada ponto de dados. Caso haja espalhante de mais de 10% em ponto de dados, são indicadas as duas medições mais extremas (barra tracejada). Os fragmentos de anticorpos testados foram divididos por dois gráficos, A e B. Nos controles A negativos, o vírus foi omitido (ausência de vírus) ou adicionou-se VHH não específico de rotavírus. O fragmento de VHH não específico é específico para o hormônio da gravidez humana hCG. Foi descrito o isolamento deste fragmento (Spinelli, S., Frenken, L., Bourgeois, D., de Ron, L., Bos, W., Verrips, T., Anguille, C., Cambillau, C. e Tegoni, M., *The Crystal Structure of a Llama Heavy Chain Domain*, *Nat. Struct. Biol.* (1996) 3: 752-757; Frenken, L. G. J. et al, *Isolation of Antigen Specific Llama V_{HH} Antibody Fragments and their High Level Secretion by *Saccharomyces cerevisiae**, *J. Biotechnol.* (2000) 78, 11-21).

Desta forma, utilizando este método, foi identificada uma série de fragmentos de VHH que podem inibir infecções por rotavírus em sistema *in vitro*.

EXEMPLO 3

INIBIÇÃO DE ROTAVÍRUS *IN VIVO* EM CAMUNDONGOS

Alguns dos fragmentos de VHH selecionados por meio da abordagem descrita no Exemplo 2 foram utilizados em experimentos *in vivo* para estudar a eficácia destes fragmentos de anticorpos na prevenção ou

tratamento de diarreia induzida por rotavírus em camundongos. Este modelo de sistema vem sendo utilizado freqüentemente para o estudo de infecções por rotavírus (Ebina, T., Ohta, M., Kanamaru, Y., Yamamotoosumi, Y., Baba, K., *Passive Immunisations of Suckling Mice and Infants with Bovine Colostrum*
 5 *Containing Antibodies to Human Rotavirus*, *J. Med. Virol.* (1992) 38: 117-123).

Fêmeas de camundongos BALB/c negativas para rotavírus prenhas por quatorze dias foram obtidas por meio da Möllegård, Dinamarca. Os camundongos foram abrigados individualmente na instalação de animais do Hospital de Huddinge. Foi obtida aprovação do comitê ético local do Instituto
 10 Karolinska no Hospital Huddinge, Suécia. Alimentação em pelotas normal e água foram fornecidas à vontade.

A fim de examinar se os fragmentos podem inibir infecções quando unidos a rotavírus (RV), fragmentos de VHH selecionados foram previamente misturados com quantidades tituladas (2×10^7 ffu) ou RRV antes
 15 da sua utilização para infecções no dia 1.

Filhotes de camundongos com quatro dias de idade foram tratados diariamente com fragmentos de VHH, incluindo o dia 0 (dia antes da infecção) até o dia 4 (Fig. 2), inclusive, e determinou-se a diarreia. Notável redução da ocorrência de diarreia foi observada para o fragmento de anticorpo
 20 2B10, exibido na Figura 2. O número de filhotes com diarreia é significativamente mais baixo no dia 2 no grupo que recebe fragmento 2B10 em comparação com o grupo não tratado. Além disso, nos dias 3, 4 e 5, nenhum dos filhotes no grupo tratado com 2B10 exibiu sinais de diarreia em comparação com a maior parte dos filhotes nos demais grupos tratados com
 25 RRV (Fig. 2). Nenhum efeito estatisticamente significativo do fragmento de VHH não relacionado RR6 (dirigido contra tinturas azo; Frenken, L. G. J. et al, *Isolation of Antigen Specific Llama V_{HH} Antibody Fragments and their High Level Secretion by Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.* (2000) 78, 11-21)

foi encontrado em comparação com o grupo não tratado.

Além disso, a quantidade média de dias de diarreia por filhote de camundongo foi calculada para cada grupo de tratamento como o número de dias de diarreia por filhote dividido pelo número total de filhotes por grupo de tratamento. Para os grupos tratados com fragmento 2B10, concluiu-se que é
5 significativamente reduzido para $0,33 \pm 0,21$ dias em comparação com $2,87 \pm 0,29$ dias para o grupo não tratado.

É importante observar que, a partir de agora nos exemplos a seguir, o plasmídeo derivado de pUR5071 que contém o gene codificador do
10 fragmento 2B10 foi denominado pUR655 e o anticorpo codificado foi renomeado fragmento VHH1 (Peter Pouwels et al, *Lactobacilli as Vehicles for Targeting Antigens to Mucosal Tissues by Surface Exposition of Foreign Antigens*).

EXEMPLO 4 (A A K)

15 Experimentos adicionais separados similares aos Exemplos 1 a 3 foram conduzidos conforme segue:

A. CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO VHH1 E scFv-2A10 ANTI-ROTAVÍRUS.

RNA total foi extraído de hibridoma que secreta mAb 2A10 anti-
20 rotavírus (classe IgA) (Giammarioli et al (1996), *Virology* 225: 97-110)). Sequências codificadoras de regiões variáveis das cadeias pesada (VH) e leve (VK) foram amplificadas utilizando kit 5' RACE (Sistema 5' RACE para Amplificação Rápida de Extremidades de cDNA (Versão 2.0, Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad CA). Os primers para o 5' RACE de VH foram:

25 ACRACE1: 5'-CAGACTCAGGATGGGTAAC-3';
ACRACE2: 5'-CACTTGAATGATGCGCCACTGTT-3';
ACRACE3: 5'-GAGGGCTCCCAGGTGAAGAC-3'; enquanto os primers:

mkRACE1 (5'-TCATGCTGTAGGTGCTGTCT-3');

mkRACE2 (5'-TCGTTCACTGCCATCAATCT-3'); e

mkRACE3 (5'-TGGATGGTGGGAAGATGGAT-3')

foram utilizados para amplificar a região variável da cadeia leve. O

5 produto de PCR com extremidade A resultante foi clonado em vetor pGEM®-T easy com sobreposições 3'-T e seqüenciado. As seqüências VH e VK foram fundidas entre si com ligante que codifica gene (com a seqüência de aminoácidos (G₄S)₃). As duas cadeias foram novamente amplificadas a partir dos produtos 5' RACE clonados utilizando os primers:

10 Clal-VHs (5'-TTTTATCGATGTGCAGTTGGTGGAGTCTGG-3'); e

Ligante-VHas (5'-CGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCC
TGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGG-3');

Ligante-VKs (5'-GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG
CGGTGGCGGATCGGACATTGTGATGACCCAGTC-3'); e

15 EcoRI-Vkas (5'-TTTTGAATTCTTTTATTTCCAGCCTGGTCC-3').

Os produtos de PCR VH e VK resultante foram misturados entre si e utilizados como modelo para PCR de fusão utilizando os primers Clal-VHs e EcoRI-VKas.

Os produtos de PCR fundidos foram clonados em vetor pGEM®-T easy após a adição de sobreposição A utilizando *Taq* DNA polimerase. A seqüência

20 codificadora de scFv-2A10 fundida foi finalmente cortada dos plasmídeos utilizando *EcoRI* mais *Clal* e subclonada em pBluescript II SK (+) (Stratagene, La Jolla CA) que contém marca E (pBS-marca E).

O VHH1 foi amplificado a partir de pUR655 utilizando primer com sentido que contém local de restrição de *Clal* e primer sem sentido que contém

25 local de restrição de *EcoRI* e, em seguida, inserido no vetor pBS-marca E. Para a geração de fragmentos de anticorpos expressos na superfície, scFv-2A10-marca E e VHH-1-marca E foram extirpados do vetor pBS-marca E utilizando locais de restrição *Clal* e *XhoI* e fundidos a seqüência de ancoramento, os

últimos 244 aminoácidos da proteína proteinase P de *L. casei* (Krüger et al, *Nature Biotechnol.* (2002) 20: 702-706) no vetor de expressão de *Lactobacillus* pLP502 (Fig. 3A e 3C). Para gerar o fragmento de anticorpo secretado, códon de parada (TAA) foi inserido por meio de amplificação de PCR após a marca E e os produtos foram inseridos em pLP502 entre os locais de restrição *Clal* e *XhoI* (Fig. 3B e 3D). O vetor pLP502 contém o promotor constitutivo do gene *lactato desidrogenase (Pldh)* (Pouwels et al, *Lactobacilli as Vehicles for Targeting Antigens to Mucosal Tissues by Surface Exposition of Foreign Antigens, Methods in Enzymology* (2001) 336: 369-389). Transformação em *L. paracasei* foi realizada conforme descrito anteriormente (Krüger et al, 2002 conforme acima).

B. COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TRANSGENES ESPECÍFICOS DE ANTICORPOS EM LACTOBACILOS TRANSFORMADOS.

RNA total foi extraído de diferentes construções de lactobacilos até OD₆₀₀ de 0,8 (QIAGEN) e transcrição reversa foi realizada após a digestão de DNA residual com RQ1 DNase (Promega). A quantidade de RNAm para os diferentes fragmentos de anticorpos foram medidos utilizando o kit central qPCR® para SYBR® verde I (MedProbe, Oslo, Noruega) e sistema de detecção de seqüências ABI PRISM 7000 (PE Applied Biosystems, Foster City CA). Tempos de perfil típicos utilizados foram: etapa inicial, 95 °C, dez minutos seguido por segunda etapa, 95 °C por quinze segundos e 58 °C por um minuto, quarenta ciclos. cDNA reunido foi utilizado para a geração de curva padrão de 16SrRNA e o inserto de anticorpo utilizando os primers:

- p0 (5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'); e
- p6 (5'CTACGGCTACCTTGTACGA 3') para o 16SrRNA; e
- primers prtpsp (5'TCTTGCCAGTCGGCGAAAT 3'); e
- *XhoI*-VHH (5'CCGCTCGAGTGCGGCACGCGGTTCC 3') para

o inserto.

C. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS SECRETADOS.

Para purificação de fragmentos de anticorpos secretados por VHH1, *L. paracasei* que contém as construções foram cultivados até OD₆₀₀ de 0,8. Após a centrifugação, o pH dos sobrenadantes foi ajustado em 7 e foram
 5 filtrados através de filtro de 0,45 µm. Os fragmentos de anticorpos secretados foram purificados em seguida de acordo com as instruções fornecidas no Módulo de Purificação RPAS (Amersham-Bioscience, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Diálise por uma noite a 8 °C foi realizada com membrana Spectra/Por® MWCO 6-8000 (Spectrum Medical Industries, Inc.,
 10 Los Angeles CA) contra 1xPBS. Os fragmentos de anticorpos purificados foram conduzidos em gel de SDS-poliacrilamida a 15% para verificar a pureza da amostra e a concentração de proteína total foi determinada por meio do teste de proteínas BioRad (BioRad Laboratories, Hercules CA).

D. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.

L. paracasei que contém as construções 2A10-âncora, VHH1-âncora, 2A10-secretadas, VHH1-secretadas, irrelevantes-secretadas e irrelevantes-âncora foram cultivados em caldo MRS que contém 3 µg/ml de eritromicina até OD₆₀₀ de 0,8. As bactérias foram lisadas em 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, que contém 10 mg/ml de lisozima a 37 °C por uma hora e, em
 20 seguida, rompidas por meio de sonicação (6 x ciclos de liga/desliga de 30 s) com ciclo de trabalho a 60% (Digital Sonifier®, modelo 250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury CT). Fragmentos foram removidos por meio de centrifugação. Os sobrenadantes foram concentrados a 50x utilizando
 25 ultrafiltração (Amicon, Beverly MA). Utilizou-se teste de proteína BioRad para determinar a concentração de proteína conforme descrito acima.

E. TESTE IMUNOABSORVENTE LIGADO POR ENZIMAS E CITOMETRIA DE FLUXO.

Placas de 96 cavidades ELISA foram revestidas com soro anti-

rotavírus humano de coelho (1/1000). Diluição 1:100 de estoque rotavírus de *Rhesus* (RRV) foi utilizada para revestimento secundário. Após o bloqueio, as placas foram incubadas com os extratos de proteína ou sobrenadantes concentrados. Anticorpos anti-marca E de camundongos (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, Reino Unido) ou anticorpos anti-lhama de coelhos, anticorpos anti-camundongos de cabra conjugados a rabanete silvestre (HRP) ou anticorpos anti-coelhos de suínos (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca) e substrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados e a absorção foi medida a 630 nm utilizando leitor de microplacas Vmax (Molecular Devices, Sunnyvale CA). Todos os anticorpos foram diluídos 1/1000. Anticorpos 2A10 monoclonais e VHH1-marca E purificados foram utilizados como padrão para determinar a concentração de fragmentos de anticorpos produzidos pelos diferentes transformadores de lactobacilos.

Conduziu-se citometria de fluxo de acordo com protocolos padrão utilizando anticorpos anti-marca E e as amostras foram analisadas utilizando máquina FACS Calibur (Becton Dickinson, Estocolmo, Suécia).

Os resultados são exibidos na Figura 4a.

F. MICROSCOPIA ELETRÔNICA SEM TEM.

Para cultivos em Microscópio Eletrônico de Varrimento (SEM) de transformadores de lactobacilos que expressam VHH1 ancorado sobre a superfície e o *L. paracasei* não transformado foram misturados com RRV e, após a incubação, fixados e adicionados sobre lâmina revestida com RC58 revestida com poli-L-lisina. As lâminas foram analisadas por meio de SEM (JEOL JSM-820, Tóquio, Japão) a 15 kV.

Para Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM), RRV foi adicionado sobre telas, mergulhado em sobrenadante (concentrado 25 vezes) a partir dos lactobacilos que expressam VHH1 secretado ou sobrenadante do *L. paracasei* não transformado. Adicionou-se em seguida anticorpo anti-marca

E de camundongo (1:1000) e 10 nm de anticorpos IgG anti-camundongo de cabra marcados com ouro (1:1000) (Amersham Biosciences). As telas foram analisadas por meio de TEM (microscópio eletrônico de transmissão Tecnai 10, Fei Company, Países Baixos) a 80 kV.

5 Os resultados são exibidos na Figura 4b e na Figura 11.

G. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE VÍRUS.

Rotavírus de Rhesus foi cultivado em células MA104 conforme descrito anteriormente. RRV purificado em placas foi utilizado ao longo de todo o estudo. Estoque de vírus isolado foi produzido para todo o estudo por meio de infecção de células MA104 com RRV em uma série de infecções (MOI) de 0,1 em meio M199 livre de soro (Gibco Laboratories, Grand Island NY) que contém 0,5 µg de tripsina (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) por mililitro. Quando o efeito citopatogênico atingiu cerca de 75% da monocamada, células foram congeladas e descongeladas por duas vezes e os lisatos celulares foram limpos por meio de centrifugação sob baixa velocidade. A suspensão de vírus foi dividida em parcelas e armazenadas a -80 °C até o uso. Foi realizada determinação de títulos de vírus por meio de teste de redução do foco de imunoperoxidase. Um único estoque de vírus foi produzido para todo o estudo.

H. TESTES DE NEUTRALIZAÇÃO IN VITRO.

20 Lactobacilos que expressam anticorpos foram adicionalmente testados para determinar o efeito inibidor sobre rotavírus por meio de teste de microneutralização conforme descrito anteriormente (Giammarioli et al, 1996 conforme acima). Para fragmentos de anticorpos ancorados, as bactérias foram diluídas em série em meios MEM e incubadas por uma hora a 37 °C com 200 ffu de RRV ativado por tripsina (100 µl). Ao final da incubação, bactérias foram removidas por meio de centrifugação e o sobrenadante foi utilizado para inocular monocamadas celulares MA104 cultivadas em placas com 96 cavidades. Sobrenadantes de cultivos concentrados de lactobacilos que

secretam fragmentos de anticorpos, puros ou diluídos em MEM, foram utilizados para incubação com RRV e inoculação de monocamadas de células MA104. As placas inoculadas foram incubadas a 37 °C por uma hora, lavadas com meio MEM, recebem meio MEM novo suplementado com antibióticos (gentamicina e penicilina/estreptomicina) e são incubadas a 37 °C em atmosfera de CO₂ por dezoito horas. Monocamadas foram fixadas e manchadas com imunoperoxidase conforme descrito (Svensson et al, 1991 conforme acima). Redução na quantidade de células infectadas com RRV de mais de 60% com relação ao número em poços de controle foi considerado como indicando neutralização. Fragmentos de VHH1 purificados produzidos por lactobacilos foram utilizados na forma de controle positivo.

Resultados são exibidos na Figura 5.

I. TESTES *IN VIVO*.

Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo comitê ético local do Karolinska Institutet no Hospital Huddinge, Suécia. Fêmeas de camundongos BALB/c prenhas foram adquiridas da Møllegaard, Dinamarca. Filhotes com quatro dias de idade foram utilizados para o estudo. Os filhotes receberam 10 µl de tratamentos diferentes uma vez por dia, a partir do dia -1 até o dia 3. Lactobacilos foram administrados uma vez, um dia antes do desafio com rotavírus. Infecções foram realizadas oralmente no dia 0 utilizando 2 x 10⁷ ffu RRV em volume de 10 µl.

A ocorrência de diarreia foi registrada diariamente até o dia 4. Os filhotes sofreram eutanásia utilizando pentobarbital intraperitoneal no dia 5. Seções de intestinos delgados foram estabilizadas em RNAlater® (QIAGEN) para isolamento de RNA ou fixadas em formalina tamponada neutra para análise histopatológica ou novamente suspensas em PBS estéril para o estudo de sobrevivência de *Lactobacillus*. Foram conduzidos quatro experimentos independentes com vários lactocorpos, testando inicialmente o comportamento

de reação à dosagem das bactérias que produzem fragmentos de VHH1 ancorados a VHH1, testando em seguida outros lactocorpos na dose ideal. Os lactocorpos controle que expressam fragmentos de anticorpos irrelevantes ou lactobacilos não transformados foram incluídos em cada experimento. Grupo
5 somente com infecção também foi incluído em cada experimento.

Para avaliar a sobrevivência de lactobacilos no intestino de camundongos, filhotes receberam uma vez lactobacilos que expressam VHH1 ancorado no dia -1 e a metade deles foi infectada com RRV no dia 0. Dois filhotes em cada grupo sofreram eutanásia e seções do intestino delgado foram
10 removidas nos dias 1, 3, 7 e 14. A presença de transformadores foi determinada por meio de cultivo de extratos intestinais sobre placas Rogosa que contêm eritromicina (3 µg/ml). Utilizou-se PCR para detecção do inserto de VHH1.

Os resultados são exibidos na Figura 6.

J. ANÁLISE DE AMOSTRAS INTESTINAIS.

15 Seções do intestino delgado foram tomadas no dia 4 e sofreram perfusão com formalina tamponada neutra a 4% e foram efetuadas manchas com hematoxilina e eosina após seccionamento de acordo com os protocolos padrão. Lâminas individuais sofreram avaliação cega para determinar sinais típicos de infecções por rotavírus.

20 RNA celular total foi isolado de tecido do intestino delgado e utilizado para análise em tempo real após a digestão de DNA genômico residual utilizando DNase® livre de RNase. Kit de reagentes centrais EZ RT-PCR® (PE Applied Biosystems, Foster City CA, Estados Unidos) foi utilizado para PCR em Tempo Real. Curva padrão foi gerada utilizando vetor pet28a (+)
25 com o gene *vp7* RRV clonado entre os locais de restrição de *NcoI* e *XhoI*. RNA genômico viral ou RNAm *vp7* de rotavírus foi amplificado a 58 °C (ciclizador ABI 7000, Applied Biosystems) na presença de 600 nM de primers, 300 nM de sonda, 5 mM de Mn para gerar amplicon com 121 bp de comprimento. O primer

com sentido (VP7f: 5'-CCAAGGGAAAAT GTAGCAGTAATTC-3') (nucleotídeo (nt) 791-815), o primer sem sentido (VP7r: 5'-TGCCACCATTCTTT CCAATTAA-3'), (nt 891-912) e a sonda (5'-6FAM-TAACGGCTGATCCAACCACAGCACC-TAMRA-3' (nt 843-867) foram
 5 projetados com base na sequência de gene *vp7* de rotavírus de rhesus (número de acesso AF295303). O nível mais baixo de detecção de PCR é de dez cópias de RNA viral. As amostras de RNA de cada animal foram normalizadas para o gene doméstico interno controle GAPDH (Overbergh et al (1999), *Cytokine* 11: 305-312). A detecção de genomas sem nenhum vírus ou
 10 com menos de dez vírus foi definida como ausência de infecção.

Os resultados são exibidos na Figura 7.

K. EXPRESSÃO *IN SITU* DOS FRAGMENTOS DE VHH1 SOBRE A SUPERFÍCIE DE LACTOBACILOS NAS FEZES.

Amostras de fezes de três animais dos grupos que recebem os
 15 lactobacilos que expressam os fragmentos ancorados a VHH1, lactobacilos não transformados ou grupo não tratado foram recolhidas no dia do término. As amostras foram cortadas em lâmina de vidro revestida Super frost e fixadas por metanol: acetona (1:1) por dez minutos sobre gelo. Anticorpo anti-marca E de camundongo (1/200) e, em seguida, anticorpo anti-camundongo de burro
 20 marcado com cy2 (1/200) foram adicionados às lâminas e incubados por uma hora sob condições úmidas. Fragmentos de VHH1 expressos na superfície foram detectados por microscópio de fluorescência.

ESTATÍSTICAS:

As doenças de diarreia em filhotes foram determinadas com base
 25 na consistência das fezes. Diarreia aquosa recebeu avaliação 2 e evacuação solta recebeu avaliação 1, nenhuma evacuação ou evacuação normal recebeu avaliação 0. O percentual de avaliações de diarreia foi calculado a cada dia. A avaliação diária total em grupo de tratamento foi comparada com grupo não

tratado por meio de teste exato de Fisher. A severidade foi definida como a soma de avaliação de diarreia para cada filhote durante o transcurso do estudo e a duração foi definida como a soma de dias com diarreia. Tanto a severidade quanto a duração foram analisadas por meio de testes Kruskal Wallis e Dunn.

5

RESULTADOS:

DISCUSSÃO DE FIGURAS E TABELAS

TABELA 2

DURAÇÃO E SEVERIDADE DE DIARRÉIA EM DIFERENTES GRUPOS DE TRATAMENTO

	Duração (média ± desvio padrão)	P	Severidade (média ± desvio padrão)	P
VHH1 ank (27)	1,222 ± 0,163	Vs não tratado < 0,01 Vs irrelevante < 0,05	1,667 ± 0,250	Vs não tratado < 0,001 Vs irrelevante < 0,01
Não tratados (30)	2,133 ± 0,104	-	3,733 ± 0,1656	-
<i>L. paracasei</i> (17)	1,941 ± 0,200	-	2,882 ± 0,352	-
VHH ank irrelevante (17)	2,118 ± 0,169	-	3,353 ± 0,283	-
VHH1 sec (10)	1,909 ± 0,162	-	2,727 ± 0,237	-
2A10 ank (10)	2,000 ± 0,258	-	2,600 ± 0,3712	-
2A10 sec (10)	2,100 ± 0,233	-	2,900 ± 0,233	-
VHH1 ank previamente incubado (10)	1,200 ± 0,249	-	1,700 ± 0,395	Vs não tratado < 0,01
VHH1 ank liofilizado (7)	1,286 ± 0,285	-	1,857 ± 0,404	Vs não tratado < 0,05

10 A Fig. 4a demonstra que a expressão na superfície de 2A10-scFv e VHH1 por lactobacilos foi exibida por meio de citometria de fluxo utilizando anticorpo anti-marca E. Nível mais baixo de detecção da marca E foi observado

em lactobacilos que produzem os fragmentos ancorados a 2A10 em comparação com os fragmentos de controle scFv e VHH irrelevantes e ancorados a VHH1 que expressam bactérias (dados não exibidos).

A atividade de união dos fragmentos de anticorpos foi analisada por meio de ELISA e microscopia eletrônica. Para ELISA, homogeneizados de lactobacilos transformados com 2A10-âncora e VHH1-âncora e sobrenadante dos lactobacilos transformados secretados por VHH1 e secretados por 2A10 foram testados utilizando a marca E para detecção. Fragmentos de anticorpos, ancorados a VHH1, secretados por VHH1 e ancorados a 2A10, expressos por lactobacilos uniram-se a placas revestidas com rotavírus. Nível mais alto de união foi observado para os fragmentos de VHH1 de lhama, tanto ancorados quanto secretados (purificados e do sobrenadante). A quantidade de 2A10 secretado foi baixa demais para detecção por meio de ELISA. Os fragmentos de anticorpos irrelevantes de *L. paracasei* não transformados de lactobacilos transformados que expressam scFv secretado ou ancorado e VHH ancorado ou secretado não se uniram a rotavírus (dados não exibidos). Calculou-se que a quantidade de fragmentos de anticorpos produzidos pelos transformadores de VHH1-âncora é de cerca de 10^4 fragmentos de VHH1/bactéria e 600 fragmentos de 2A10/bactéria (intracelular e sobre a superfície). Os transformadores secretados por VHH1 produziram cerca de 1 $\mu\text{g/ml}$ de fragmentos de VHH1 no sobrenadante.

As Figuras 4b e 11a exibem lactobacilos que expressam fragmentos de anticorpos VHH1 sobre a sua superfície, que foram incubados com rotavírus e analisados em seguida por meio de SEM. Os resultados exibiram a união do vírus sobre a superfície bacteriana (Fig. 4ba e 11b), mas não a linhagem de *L. paracasei* não transformada (Fig. 11b). Utilizando TEM (manchas negativas), a união ao vírus por fragmentos de anticorpos de lhama do sobrenadante de lactobacilos transformados com o vetor secretado por

VHH1 poderá ser demonstrada, enquanto o sobrenadante controle de linhagem de *L. paracasei* não transformado não uniu rotavírus (dados não exibidos).

O efeito de fragmentos de anticorpos produzidos por *Lactobacillus* em teste de neutralização de rotavírus foi analisado na Figura 5. A linha sólida desta figura representa o nível de neutralização atingido por anticorpo VHH1 purificado por marca E produzido por lactobacilos (20 µg/ml). Linha pontilhada indica o nível de neutralização de sobrenadante de hibridoma monoclonal 2A10 (147 ng/ml). Neutralização atingida por diferentes concentrações de lactobacilos ancorados a VHH1 (■), lactobacilos ancorados a 2A10 (■) e
10 lactobacilos não transformados (□).

A Figura 5 exibe redução dependente de dosagem significativa da infecção na presença de lactobacilos que expressam VHH1 unido na superfície ou na presença do sobrenadante que contém VHH1 secretado. Leve capacidade de neutralização do sobrenadante de lactobacilos não transformados também foi observada. Os lactobacilos transformados por 2A10 (secretados e ancorados) não foram protetores, muito embora o sobrenadante das células de hibridoma monoclonal 2A10, que contém 150 ng/ml do anticorpo, tenha apresentado proteção de 95%.

A Figura 6 exibe a incidência de diarreia em camundongos tratados com lactobacilos que expressam fragmentos ancorados a VHH1. Lactobacilos que expressam VHH1 na superfície reduziram significativamente a incidência de diarreia no dia 2 sobre lactobacilos não transformados ($P = 0,0172$).

A Figura 7 demonstra que, no grupo não tratado, a histologia das seções de duodeno e jejuno revela sinais típicos de infecção por rotavírus; inchaço de extremidades vilosas, vacuolização, restrição de bases vilosas e núcleos não polarizados nas células (a). Os grupos que recebem *L. paracasei* (b) ou lactobacilos que expressam (c) ancorado em VHH1 e (d) não infectado exibem histologia razoavelmente normalizada.

A Figura 8 demonstra que a carga viral média em grupo de tratamento ancorado em VHH1 é pelo menos duzentas vezes mais baixa que o grupo não tratado. Efeito probiótico de lactobacilos controle irrelevantes também foi observado (redução de dez vezes da carga viral). A liberação do vírus foi definida como ausência de detecção de *vp7* ou detecção de menos de dez moléculas de RNA *vp7*. 27% dos animais foram liberados de rotavírus em grupo de tratamento ancorado em VHH1 em comparação com 9% no grupo não tratado.

A Figura 9 demonstra que, no dia 2, doses de 10^8 CFU e 10^9 CFU de lactobacilos que expressam fragmentos ancorados a VHH1 causam redução significativa da incidência de diarreia em comparação com o grupo não tratado, $P < 0,0001$ e $P = 0,0024$. Número de filhotes em cada grupo: sete cada em 10^7 CFU/dose e 10^8 CFU/dose e 8 em 10^9 CFU/dose e não tratados.

A Figura 10 demonstra que grupo em que infecções foram realizadas com RRV incubados com lactobacilos que expressam fragmentos ancorados a VHH1 foi incluído. O tratamento neste grupo prosseguiu conforme habitual. Lactobacilos que expressam VHH1 na superfície fornecidos em forma seca por congelamento reduziram significativamente a incidência de diarreia no dia 2 em comparação com o grupo não tratado ($P = 0,0317$). No dia 3, houve redução significativa da incidência de diarreia em grupos que recebem lactobacilos de expressão ancorados a VHH1 previamente incubados ($n = 7$; $P = 0,0004$), lactobacilos de expressão ancorados a VHH1 liofilizados ($n = 7$; $P = 0,0072$), lactobacilos de expressão ancorados a VHH1 ($n = 10$; $P = 0,0022$) em comparação com o grupo não tratado ($n = 10$). A severidade da doença, em comparação com o grupo não tratado, também foi reduzida quando *Lactobacillus* que expressa na superfície VHH1 foi administrado em forma seca por congelamento ($n = 10$; $P < 0,01$) ou quando infecções foram realizadas com RRV previamente

incubado com cultivo novo destas bactérias por duas horas ($P < 0,05$).

EXPRESSÃO *IN SITU* DE FRAGMENTOS DE VHH1 SOBRE A SUPERFÍCIE DE

LACTOBACILOS NAS FEZES (RESULTADOS DO EXEMPLO 4 (K)):

Amostras de fezes de três animais dos grupos que recebem
 5 lactobacilos que expressam os fragmentos ancorados a VHH1, camundongos
 do grupo não tratado e controle negativo foram recolhidos no dia 4, o dia do
 término, para determinação da expressão *in situ* dos fragmentos ancorados a
 VHH1. Lactobacilos que expressam VHH1 poderão ser detectados utilizando
 anticorpo anti-marca E fluorescente nos camundongos tratados. Nenhuma
 10 mancha pôde ser observada no grupo controle (dados não exibidos).

SOBREVIVÊNCIA DE LACTOBACILOS NO INTESTINO DE CAMUNDONGOS:

Filhotes foram alimentados com lactobacilos que expressam o
 VHH1 ancorado contra rotavírus por uma vez (no dia 0) e a metade deles foi
 infectada em seguida com RRV no dia 1. Dois filhotes em cada grupo foram
 15 sacrificados a cada segundo dia e verificados para determinar a presença de
 transformadores de *Lactobacillus* por meio de cultivo do teor intestinal. As
 bactérias puderam ser detectadas no duodeno e no íleo 48 horas após o
 tratamento sem diferença entre os grupos não infectados e infectados com
 rotavírus, enquanto em 96 horas após o tratamento, nenhum transformador
 20 pôde ser detectado (dados não exibidos).

EFICÁCIA DE TRANSFORMADORES DE *LACTOBACILLUS* PARA REDUZIR DIARRÉIA EM

MODELO DE INFECÇÃO POR ROTAVÍRUS:

O efeito terapêutico dos lactobacilos transformados foi testado em
 modelo de filhotes de camundongos de diarreia induzida por rotavírus. Os
 25 filhotes foram alimentados oralmente com lactobacilos que expressam 2A10-
 scFv ou VHH1 em formas secretadas ou ancoradas durante cinco dias (dia -1 a
 3) e infectados com RRV no dia 0. Grupos de controle incluíram *L. paracasei* não
 transformado e bactérias que expressam fragmento de anticorpo VHH ancorado

irrelevante. 10^8 CFU como dose ideal para intervenção em diarreia (Fig. 9). VHH1 de superfície que expressa bactérias reduziu a duração da doença (duração normal de 1,2 dias) em cerca de 0,9 dias ($P < 0,01$) e em 0,7 dias em comparação com camundongos tratados com *L. paracasei* não transformado (P 5 $< 0,05$). A severidade da diarreia também foi reduzida de 3,7 para 1,7 em camundongos tratados com lactobacilos que expressam VHH1 na superfície em comparação com a severidade da doença em filhotes não tratados ($P < 0,001$) e por fator de 1,2 em comparação com filhotes tratados com *L. paracasei* não transformado ($P < 0,01$). Também foi observado efeito probiótico menor pelos 10 lactobacilos não transformados (Tabela 2). Além disso, a incidência de diarreia foi significativamente reduzida nos dias 2 e 3 em camundongos tratados com o *Lactobacillus* que expressa VHH1 na superfície em comparação com camundongos não tratados ($P < 0,0001$ para os dois dias) ou camundongos tratados com *L. paracasei* não transformado ($P < 0,02$, para o dia 2) (Fig. 6a). As 15 construções que expressam o 2A10 secretado ou ancorado, bem como VHH1 secretado, não induziram proteção significativamente mais alta que lactobacilos não transformados (Fig. 6a, b). A severidade da doença, em comparação com o grupo não tratado, também foi reduzida quando *Lactobacillus* que expressa na superfície VHH1 foi administrado em forma seca por congelamento ($P < 0,01$) ou 20 quando foram realizadas infecções com RRV previamente incubado com cultivo novo destas bactérias por duas horas ($P < 0,05$) (Tabela 2 e Fig. 5).

Exame histológico de seções do intestino delgado próximas no dia 4 revelaram notável redução de alterações patológicas em animais infectados com rotavírus tratados com lactobacilos que expressam VHH1 na superfície e, em alguns 25 camundongos, a histologia foi completamente normalizada. A histologia no grupo que não recebe lactobacilos revelou sinais típicos de infecção com rotavírus com inchaço de extremidades vilosas, restrição de bases vilosas, vacuolização e núcleos celulares em locais irregulares (Fig. 7a, b, c, d). Para determinar se houve redução da

reprodução viral nos enterócitos, foi desenvolvida PCR em tempo real para a expressão do gene *vp7* de rotavírus. A carga viral média em animais que recebem lactobacilos que expressam fragmentos de anticorpos VHH1 unidos na superfície foi pelo menos 250 vezes mais baixa que em camundongos não tratados. Lactobacilos que expressam fragmento de VHH irrelevante também reduziram a carga de *vp7* viral (até dez vezes). A taxa de liberação foi de 27% no grupo que recebeu lactobacilos que expressam VHH1 ancorado na superfície em comparação com 9% no grupo não tratado (Figura 8).

Estes experimentos demonstram a expressão bem sucedida de fragmentos de anticorpos VHH derivados de lama (VHH1) e scFv (scFv-2A10) contra rotavírus tanto sobre a superfície de *Lactobacillus casei* 393 pLZ15 e como proteína secretada. Também foi demonstrada a eficácia destes lactobacilos recombinantes no tratamento de rotavírus por meio de neutralização *in vitro* e em modelo de infecção de filhotes de camundongos.

EXEMPLO 5

ENCAPSULAÇÃO DE ALGINATO DE CÁLCIO DE VHH ANTI-ROTAVÍRUS

Solução de alginato de sódio a 2% foi adicionada em gotas a solução de 0,1 M de cloreto de cálcio, que contém 1% do VHH, resultando na formação de esferas de alginato de cálcio (com tamanho de cerca de 2 mm). A dispersão foi mantida em repouso por trinta minutos para depósito das esferas de alginato de cálcio no fundo do beaker. As esferas foram recolhidas em seguida com peneira e lavadas uma vez com água.

EXEMPLO 6

COMPOSIÇÕES E PREPARAÇÕES DE SORVETES QUE CONTÊM VHH ANTI-ROTAVÍRUS

ENCAPSULADO OU *LACTOBACILLUS* QUE PRODUZ ESTE VHH E BACTÉRIAS

PROBIÓTICAS

O exemplo a seguir de composição de sorvete é produto alimentício de acordo com a presente invenção:

	% em peso
Sacarose	13,000
Leite desnatado em pó	10,000
Gordura de manteiga	8,000
Maltodextrina 40	4,000
Palmitato de monoglicerol (MGP)	0,300
Goma de grãos de alfarroba	0,144
Carrageno L100	0,016
Aroma	0,012

Solução de VHH encapsulada em volume que resulta em 5 a 5000 microgramas de VHH por porção.

Bactéria probiótica^{*1} em quantidade de 10^6 a 10^{11} por 100 g da composição de sorvete.

Água	Até 100
------	---------

- 5 ^{*1} A bactéria probiótica pode ser qualquer dos tipos mencionados na descrição detalhada.

Total de sólidos solúveis: 35% em peso.

Teor de gelo a -18 °C: 54% em peso.

10 Todos os ingredientes do sorvete são misturados entre si utilizando misturador de alto corte por cerca de três minutos. A água é adicionada sob temperatura de 80 °C. A temperatura da mistura de água e gelo é de cerca de 55 a 65 °C após mistura.

15 A mistura é homogeneizada em seguida (2000 psi) e passada para trocador de calor de placas para pasteurização a 81 °C por 25 segundos. A mistura é resfriada em seguida até cerca de 4 °C no trocador de calor de placas antes da utilização.

Alternativamente, linhagem de *Lactobacillus* produtora de VHH anti-rotavírus pode ser adicionada no lugar da solução de VHH encapsulada,

preferencialmente em concentração de 10^9 por porção ou mais.

A mistura prévia de sorvete é congelada em seguida utilizando trocador de calor de superfície raspada Technohoy MF 75, tal como sem sobrecondução introduzida no sorvete. O sorvete pode ser extrudado sob
5 temperatura de $-4,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-5,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O produto pode ser endurecido em seguida em congelador por impulso a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e armazenado em seguida a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solução de água com gelo que possui a composição a seguir foi preparada conforme segue:

	% em peso
Sacarose	25
Goma de grãos de alfarroba	0,5

Solução de VHH encapsulada em volume que resulta em 5 a
10 5000 microgramas de VHH por porção.

Bactéria probiótica^{*1} em quantidade de 10^6 a 10^{11} por cem gramas da composição de sorvete.

Água	Até 100
------	---------

Total de sólidos solúveis: 25,5% em peso.

Teor de gelo a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$: 62% em peso.

15 Todos os ingredientes da água com gelo são misturados entre si utilizando misturador de alto corte por cerca de três minutos. Adiciona-se água sob temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A temperatura da mistura de água com gelo é de cerca de 55 a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ após mistura.

A mistura é homogeneizada em seguida (2000 psi) e passada
20 para trocador de calor de placas para pasteurização a $81\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 25 segundos. A mistura é resfriada em seguida a cerca de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ no trocador de calor de placas antes da utilização.

Em vez da solução de VHH encapsulada neste momento, linhagem de *Lactobacillus* produtora de VHH anti-rotavírus pode também ser

adicionada, preferencialmente em concentração de 10^9 por porção ou superior.

A solução de água e gelo pode ser congelada em trocador de calor de superfície raspada Technohoy MF 75 com sobrecondução (fração de volume de ar) de 30%. A água com gelo pode ser extrudada sob temperatura de -3,8 °C a -4,5 °C. O produto pode ser endurecido em seguida em congelador por impulso a -35 °C e armazenado a -25 °C.

EXEMPLO 7

COMPOSIÇÕES DE ESPALHANTES QUE CONTÊM VHH ANTI-ROTAVÍRUS

ENCAPSULADO OU LACTOBACILLUS PRODUTOR DESTES VHH E BACTÉRIAS

PROBIÓTICAS

Foram elaborados espalhantes de acordo com procedimento padrão conforme conhecido na técnica, utilizando as composições fornecidas na Tabela 3.

TABELA 3

COMPOSIÇÕES ESPALHANTES

Componente	Quantidade (% em peso) Exemplo 1	Quantidade (% em peso) Exemplo 2	Quantidade (% em peso) Exemplo 3	Quantidade (% em peso) Exemplo 4
Mistura de gordura	39,71	39,71	39,71	39,71
Bolec ZT	0,05	0,05	0,05	0,05
Hymono 8903	0,16	0,16	0,16	0,16
β -Caroteno (1% em óleo de girassol)	0,08	0,08	0,08	0,08
Fase de gordura total	40,00	40,00	40,00	40,00
Água da torneira	Até 60	Até 60	Até 60	Até 60
Soro azedo em pó	0,27	0,27	0,27	0,27
NaCl	0,48	0,48	0,48	0,48
K-sorbato	0,12	0,12	0,12	0,12

Componente	Quantidade (% em peso) Exemplo 1	Quantidade (% em peso) Exemplo 2	Quantidade (% em peso) Exemplo 3	Quantidade (% em peso) Exemplo 4
Gelatina	1,10	1,10	1,10	1,10
Ácido cítrico	Até pH 4,6	Até pH 5,0	Até pH 4,6	Até pH 5,0
Goma xantana	0,10	0,10	0,10	0,10
Sal de cálcio TCP C13-13			1,27	1,27
CaSO ₄ .0,5H ₂ O	1,74	1,74		
pH da fase de água	4,6	5,0	4,6	5,0
VHH encapsulado	5-5000	5-5000 µg	5-5000 µg	5-5000 µg
Sol. bactérias probióticas ^{†1}	10 ⁶ - 10 ¹¹ por 100 g	10 ⁶ - 10 ¹¹ por 100 g	10 ⁶ - 10 ¹¹ por 100 g	10 ⁶ - 10 ¹¹ por 100 g
Fase de água total	Até 100	Até 100	Até 100	Até 100
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

No lugar da solução de VHH encapsulada após a última etapa de aquecimento, pode-se também adicionar assepticamente linhagem de *Lactobacillus* produtora de VHH anti-rotavírus, preferencialmente em concentração de 10⁹ por porção ou superior.

REIVINDICAÇÕES

1. PRODUTO ALIMENTÍCIO, caracterizado pelo fato de que compreende i) anticorpos ou fragmentos de anticorpos que são ativos no intestino e ii) microorganismos probióticos independentes dos anticorpos ou
5 fragmentos de anticorpos.

2. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos compreendem parte do sistema de fornecimento para fornecer os anticorpos ou fragmentos de anticorpos para o trato gastrointestinal.

10 3. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o sistema de fornecimento compreende anticorpos encapsulados ou fragmentos de anticorpos que são liberados no intestino.

4. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o sistema de fornecimento
15 compreende um microorganismo transformado para ser capaz de produzir anticorpos ou seus fragmentos.

5. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos são expressos e/ou secretados no intestino.

20 6. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma as reivindicações 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é um microorganismo probiótico, preferencialmente bactéria de ácido láctico, fungo ou levedura.

7. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das
25 reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*.

8. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o *Lactobacillus* é *Lactobacillus casei*.

9. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que os anticorpos são imunoglobulinas de cadeia pesada ou seus fragmentos do tipo VHH ou VNAR, preferencialmente derivados de Camelídeos, de maior preferência anticorpos de cadeia pesada de lhama ou seus fragmentos, ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos.

10. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos estão presentes em quantidade eficaz para tratar, reduzir ou evitar diarreia em pacientes que consomem o produto alimentício.

11. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que os microorganismos probióticos (ii) são microorganismos viáveis.

12. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que os microorganismos probióticos (ii) são microorganismos inviáveis.

13. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que os microorganismos probióticos (ii) compreendem bactéria probiótica, leveduras probióticas e/ou fungos probióticos.

14. PRODUTO ALIMENTÍCIO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a bactéria probiótica (ii) compreende *Lactobacillus* e/ou *Bifido bacterium*.

15. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de que compreende i) anticorpos ou fragmentos de anticorpos que são ativos no intestino e ii) microorganismos probióticos independentes dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos.

16. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a

reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos compreendem parte do sistema de fornecimento para fornecer os anticorpos ou fragmentos de anticorpos para o trato gastrointestinal.

5 17. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o sistema de fornecimento compreende anticorpos encapsulados ou fragmentos de anticorpos que são liberados no intestino.

10 18. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das reivindicações 16 ou 17, caracterizada pelo fato de que o sistema de fornecimento compreende um microorganismo transformado para ser capaz de produzir anticorpos ou seus fragmentos.

19. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos são expressos e/ou secretados no intestino.

15 20. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 18 ou 19, caracterizada pelo fato de que o microorganismo é um microorganismo probiótico, preferencialmente bactéria de ácido láctico, fungo ou levedura.

20 21. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das reivindicações 18 a 20, caracterizada pelo fato de que o microorganismo é *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*.

22. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que o *Lactobacillus* é *Lactobacillus casei*.

25 23. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das reivindicações 15 a 22, caracterizada pelo fato de que os anticorpos são imunoglobulinas de cadeia pesada ou seus fragmentos do tipo VHH ou VNAR, preferencialmente derivados de Camelídeos, de maior preferência anticorpos

de cadeia pesada de lhama ou seus fragmentos, ou anticorpos de domínio (dAbs) das cadeias leve ou pesada de imunoglobulinas ou seus fragmentos.

24. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das reivindicações 15 a 23, caracterizada pelo fato de que os anticorpos ou
5 fragmentos de anticorpos estão presentes em quantidade eficaz para tratar, reduzir ou evitar diarreia em pacientes que consomem a preparação farmacêutica.

25. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das reivindicações 15 a 24, caracterizada pelo fato de que os microorganismos
10 probióticos (ii) são microorganismos viáveis.

26. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das reivindicações 15 a 24, caracterizada pelo fato de que os microorganismos probióticos (ii) são microorganismos inviáveis.

27. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das
15 reivindicações 15 a 26, caracterizada pelo fato de que os microorganismos probióticos (ii) compreendem bactéria probiótica, leveduras probióticas e/ou fungos probióticos.

28. PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que a bactéria probiótica (ii)
20 compreende *Lactobacillus* e/ou *Bifido bacterium*.

29. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PRODUTO ALIMENTÍCIO, conforme definido em uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que compreende a adição dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos e os microorganismos probióticos durante a
25 fabricação do produto alimentício ou um ingrediente deste.

30. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, conforme definida em uma das reivindicações 15 a 28, caracterizado pelo fato de que compreende a adição dos anticorpos ou

fragmentos de anticorpos e os microorganismos probióticos durante a fabricação da preparação farmacêutica ou um ingrediente desta.

31. USO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO, conforme definido em uma das reivindicações 1 a 14, ou fabricado segundo o método tal como definido na reivindicação 29, caracterizado por fornecer benefícios à saúde do intestino de um paciente.

32. USO DA PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, conforme definida em uma das reivindicações 15 a 28, ou fabricada segundo o método tal como definido na reivindicação 30, caracterizado por fornecer benefícios à saúde do intestino de paciente.

33. USO, de acordo com uma das reivindicações 31 ou 32, caracterizado pela administração de microorganismos enteropatogênicos.

34. USO, de acordo com uma das reivindicações 31 a 33, caracterizado pelo fato de que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos são anticorpos de cadeia pesada de lhama ou fragmentos de anticorpos e o benefício à saúde fornecido é efeito antidiarréico.

35. USO, de acordo com conforme uma das reivindicações 31 a 34, caracterizado pela administração de infecções por rotavírus.

36. MÉTODO DE FORNECIMENTO DE BENEFÍCIOS À SAÚDE DO INTESTINO, de paciente, caracterizado pelo fato de que compreende a administração do produto alimentício ou da preparação farmacêutica conforme definidos em de acordo com uma das reivindicações 1 a 28, ou fabricados segundo o método das reivindicações 29 ou 30, à um paciente dele necessitado.

37. IMPLEMENTO DE LIBERAÇÃO PARA USO COM PRODUTO ALIMENTÍCIO, caracterizado pelo fato de que compreende microorganismos probióticos em que o implemento de liberação é revestido sobre pelo menos uma superfície com anticorpos ou fragmentos de anticorpos

que são ativos no intestino.

38. IMPLEMENTO DE LIBERAÇÃO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos compreendem sistema de fornecimento para fornecer os anticorpos ou fragmentos de anticorpos para o trato gastrointestinal.

39. IMPLEMENTO DE LIBERAÇÃO PARA USO COM PRODUTO ALIMENTÍCIO, caracterizado pelo fato de que o implemento de liberação é revestido sobre pelo menos uma superfície com anticorpos ou fragmentos de anticorpos que são ativos no intestino e microorganismos probióticos.

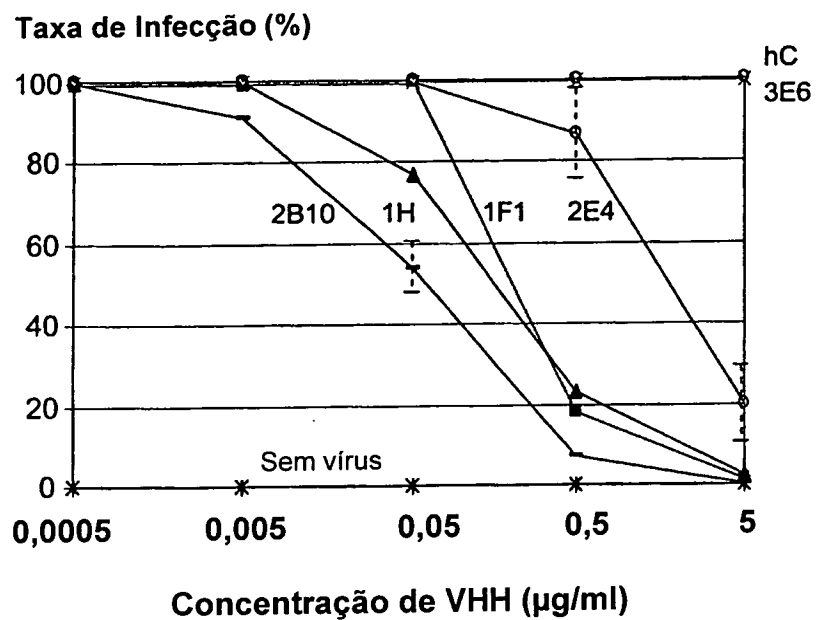
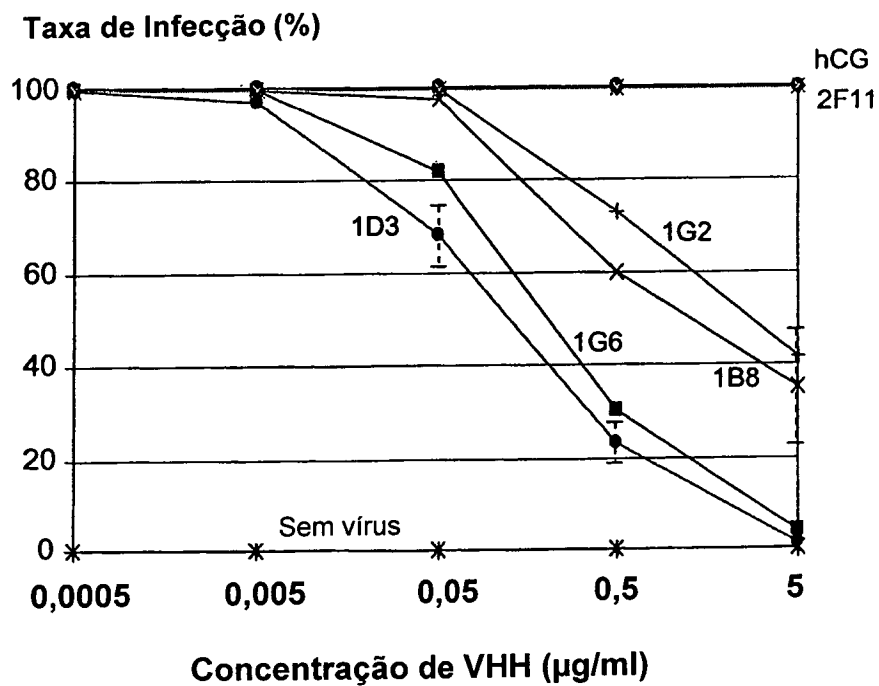
40. IMPLEMENTO DE LIBERAÇÃO, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que os anticorpos ou fragmentos de anticorpos compreendem sistema de fornecimento para fornecer os anticorpos ou fragmentos de anticorpos para o trato gastrointestinal.

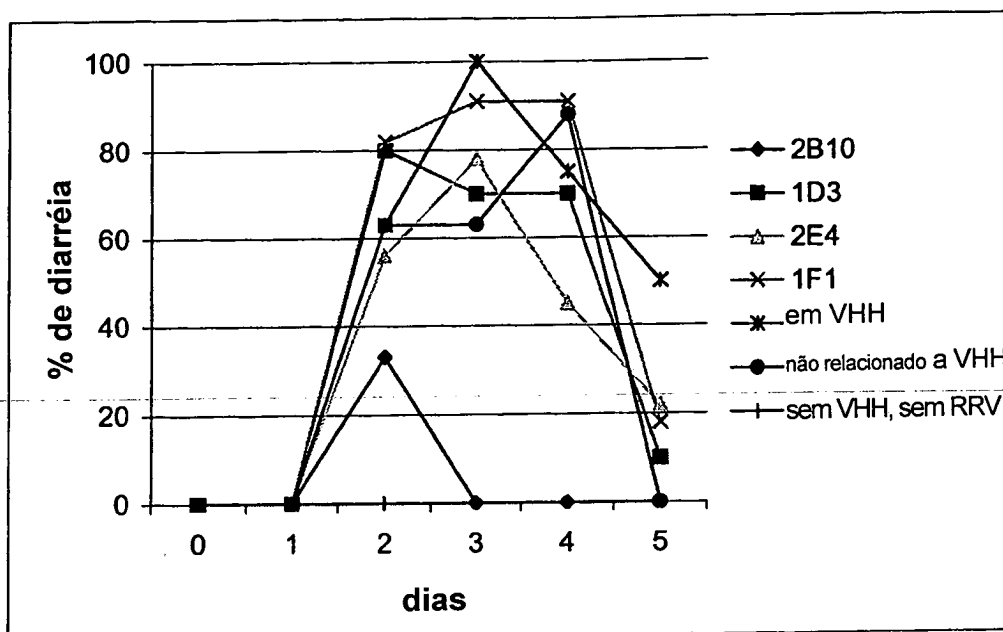
41. IMPLEMENTO DE LIBERAÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 37 a 40, caracterizado pelo fato de que o sistema de fornecimento compreende anticorpos encapsulados ou fragmentos de anticorpos.

42. IMPLEMENTO DE LIBERAÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 37 a 41, caracterizado pelo fato de que o sistema de fornecimento compreende microorganismo transformado para que seja capaz de produzir anticorpos ou seus fragmentos.

43. IMPLEMENTO DE LIBERAÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 37 a 42, caracterizado pelo fato de que o implemento de liberação é uma faca, garfo, colher, tubo, canudo para bebidas ou bastão.

44. USO DE UMA PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, conforme definida em uma das reivindicações 15 a 28, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para fornecimento de benefícios à saúde do intestino.

A**B****Fig. 1**

**Fig. 2**

a, b
c, d

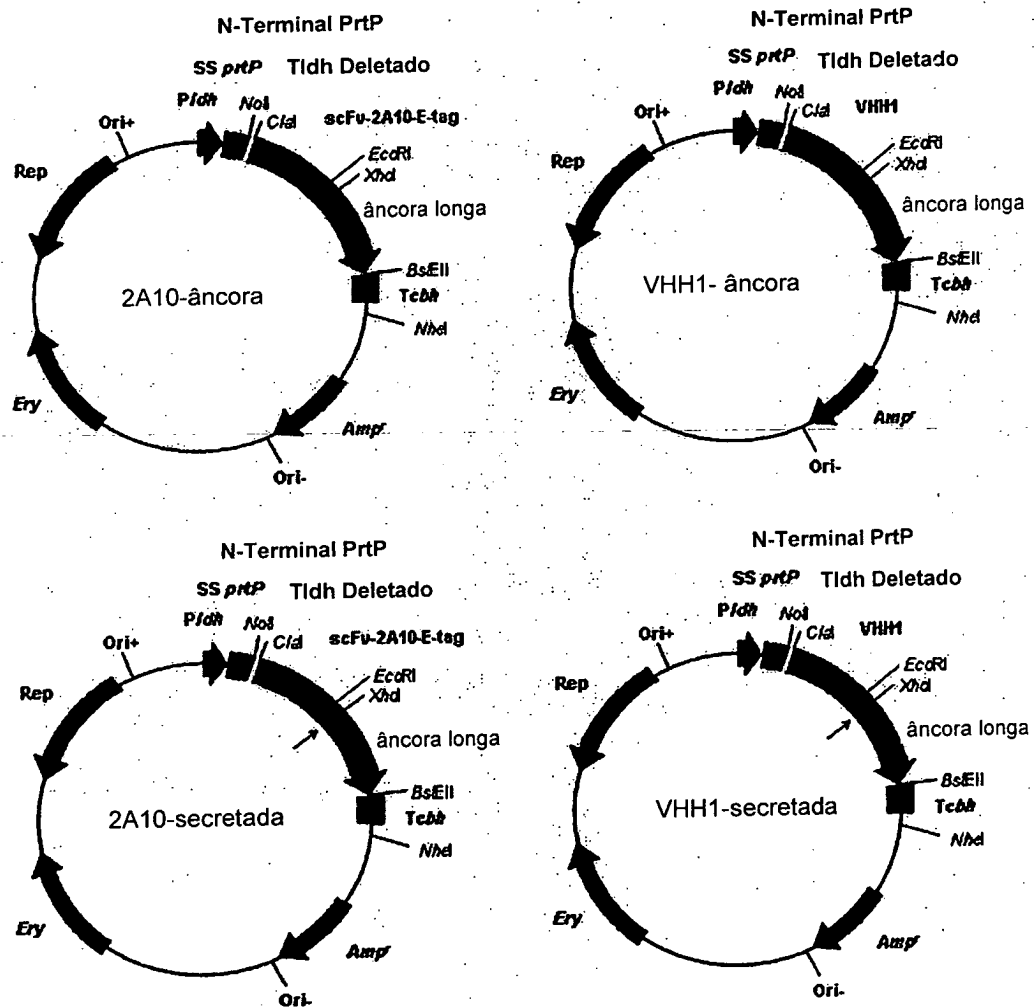
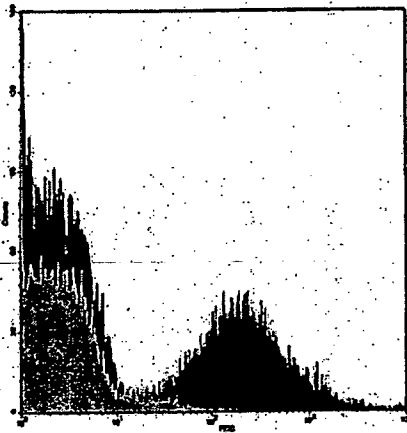


Fig. 3

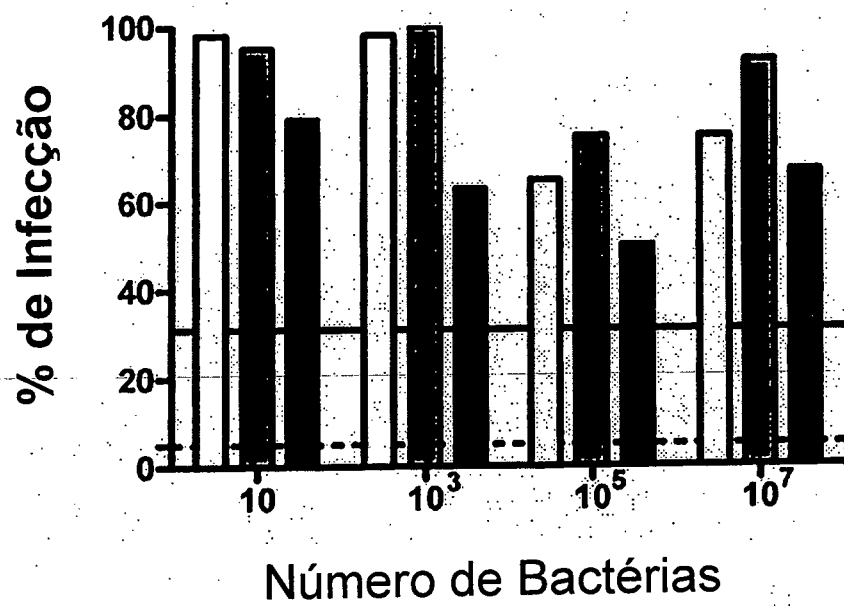
a)



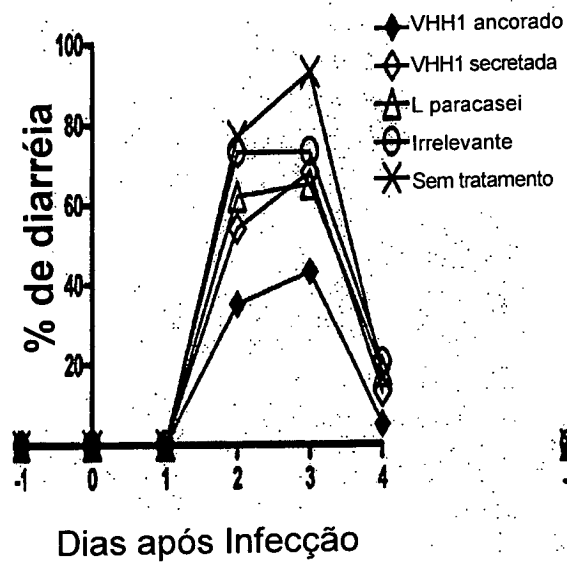
b)



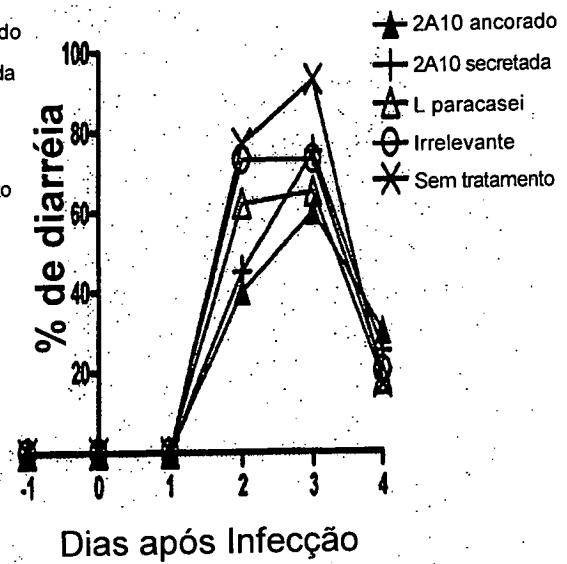
Fig. 4

*Fig. 5*

a)



b)

**Fig. 6**

a, b
c, d

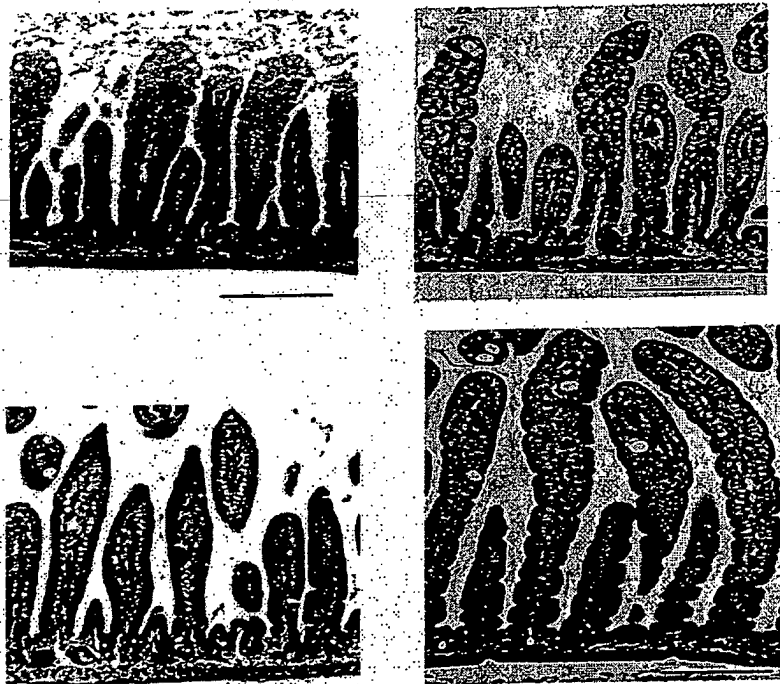
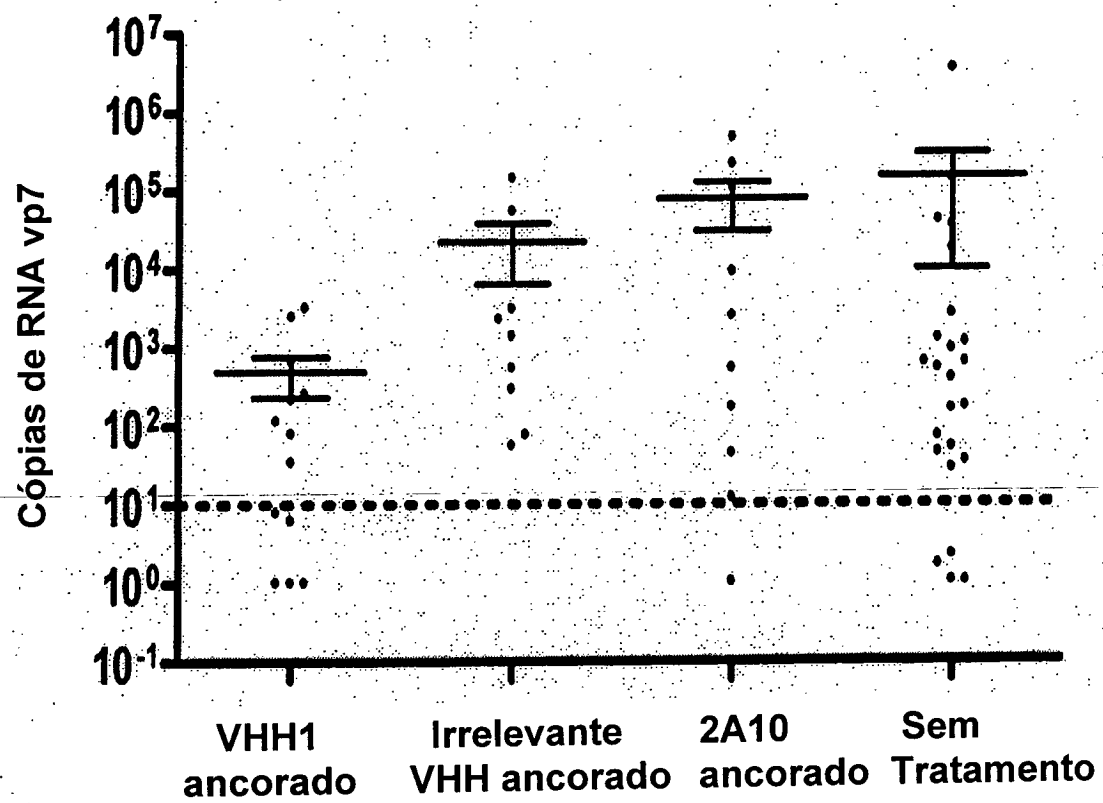
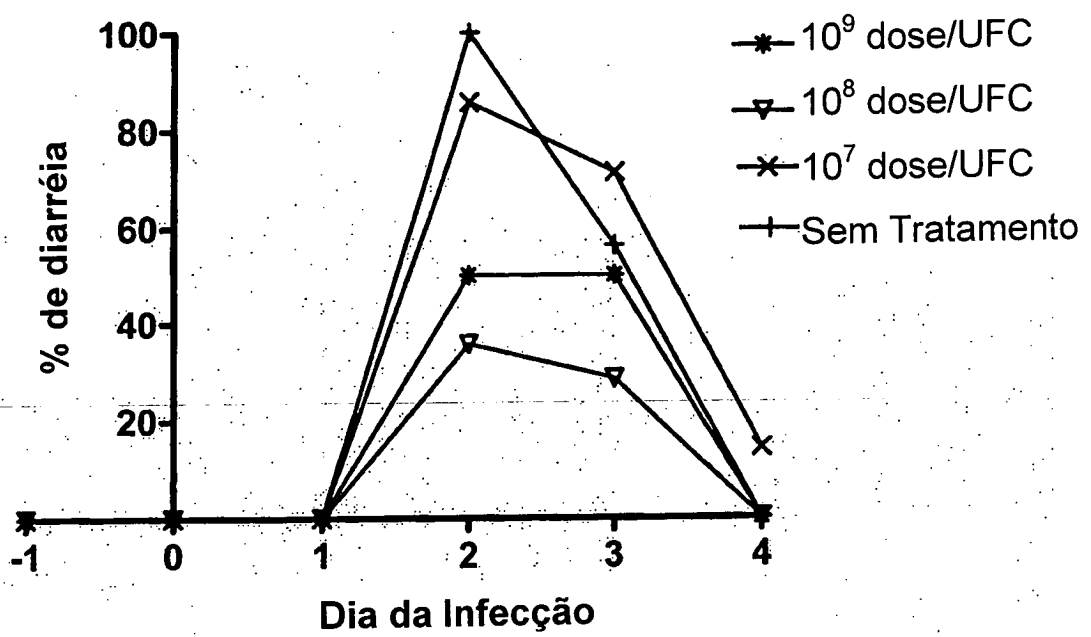
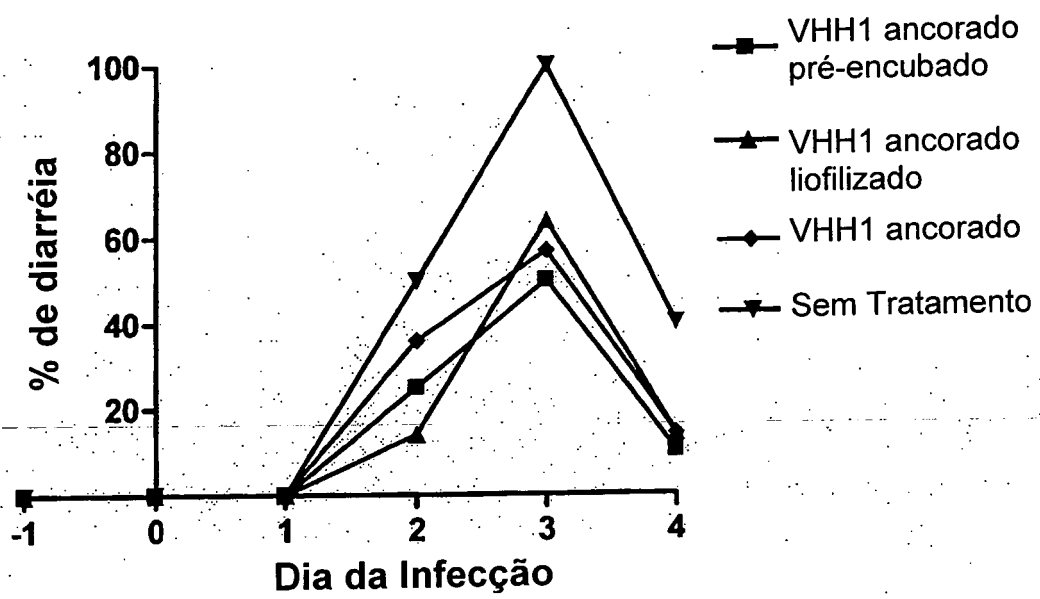


Fig. 7

**Fig. 8**

**Fig. 9**

**Fig. 10**

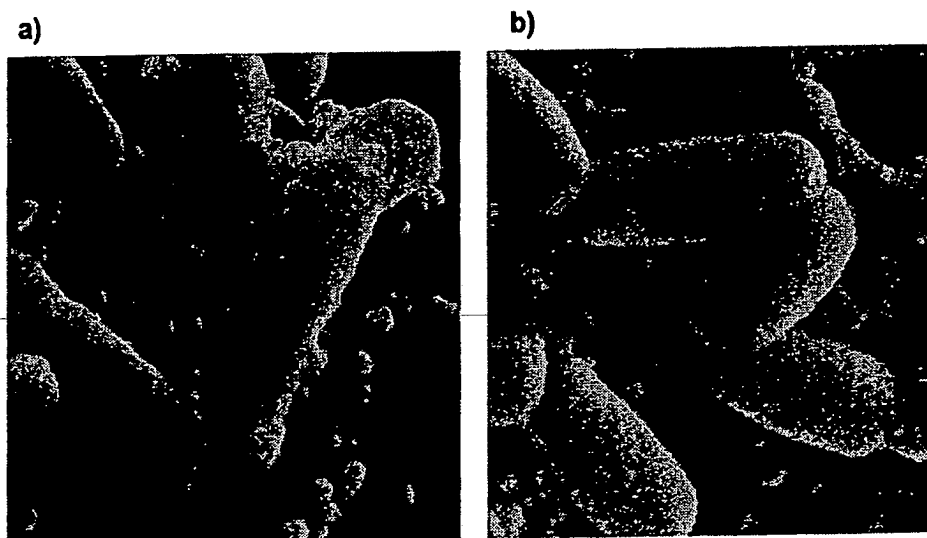


Fig. 11

RESUMO

**“PRODUTO ALIMENTÍCIO, PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE
FABRICAÇÃO DE PRODUTO ALIMENTÍCIO, MÉTODO DE FABRICAÇÃO
DE PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO PRODUTO ALIMENTÍCIO,
5 USOS DA PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE FORNECIMENTO
DE BENEFÍCIOS À SAÚDE DO INTESTINO E IMPLEMENTOS DE
LIBERAÇÃO PARA USO COM PRODUTO ALIMENTÍCIO”**

A presente invenção refere-se a produtos alimentícios ou
preparações farmacêuticas que compreendem anticorpos ou fragmentos de
10 anticorpos que são ativos no intestino e microorganismos probióticos
independentes dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos. Particularmente, a
presente invenção refere-se a método de preparação de produtos alimentícios
e preparações farmacêuticas que compreendem os anticorpos ou fragmentos
de anticorpos e microorganismos probióticos e o uso desses produtos para
15 fornecer benefícios à saúde de seres humanos.