(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 402 014**

(21) Número de solicitud: 201131469

(51) Int. Cl.:

C07K 14/335 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

07.09.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

26.04.2013

(71) Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (70.0%)
SERRANO, 117
28006 MADRID ES y
IMPERIAL COLLEGE LONDON (30.0%)

(72) Inventor/es:

SÁNCHEZ GARCÍA, Borja;
MARGOLLES BARROS, Abelardo;
BERNARDO ORTIZ, David;
KNIGHT, Stella C. y
HAFID, Omar

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

(54) Título: **PEPTIDO SECRETADO POR LACTOBACILLUS PLANTARUM CON FUNCIÓN INMUNOMODULADORA**

(57) Resumen:

Peptido secretado por Lactobacillus plantarum con función inmunomoduladora.

La presente invención se refiere a un péptido aislado de Lactobacillus plantarum, con propiedades inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias, cuya secuencia tiene al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO: 1. La invención, también se refiere al uso de dicho péptido en la fabricación de un medicamento o composición farmacéutica para tratamiento y/o prevención de una afección intestinal, o en la preparación de un alimento funcional y/o en la preparación de un cosmético.

ES 2 402 014 A1

DESCRIPCIÓN

Péptido secretado por Lactobacillus plantarum con función inmunomoduladora.

La presente invención, que describe el uso de un péptido secretado por un lactobacilo en inmunoterapia humana, puede encuadrarse tanto en el sector de la tecnología de los alimentos como en el de la medicina. Se trata de la secuencia de aminoácidos (péptido ST), que podría ser utilizado en la inmunoterapia de ciertas enfermedades inflamatorias, como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII; dividida en Enfermedad de Chron, Colitis Ulcerosa y Pouchitis) y en otras patologías donde la tolerancia oral se encuentra comprometida (como en el caso de la enfermedad celiaca frente al gluten de la dieta). La vía de administración podría ser su inclusión en un alimento funcional o vía maduración dirigida de células dendríticas del donante (vacunas de células dendríticas).

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El tracto gastrointestinal humano es el hogar de una amplia variedad de bacterias comensales, mutualistas y patógenas y donde precisamente, se encuentra una de los principales puntos de contacto entre bacterias y sistema inmune. Este conjunto de bacterias contribuye, en gran medida, al conjunto de antígenos o sustancias extrañas junto con los antígenos de la dieta contra las que, en condiciones normales, el sistema inmune reaccionaría con el fin de eliminarlas como así ocurre en la inmunidad sistémica. Sin embargo, en el compartimento intestinal esto no transcurre ni mucho menos así, y en su lugar se despliega un mecanismo de tolerancia inmunológica frente a dichos antígenos denominado tolerancia oral, destinado a mantener la homeostasis de la mucosa (Feng y Elson (2010) Adaptive immunity in the host – microbiota dialog. *Muc. Immunol.* 4, 15-21). En determinadas ocasiones, esta homeostasis se pierde y el sistema inmune reacciona de forma anómala contra la microbiota intestinal, desarrollándose procesos inflamatorios más o menos severos como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) o frente a algunos antígenos de la dieta (como es el caso del gluten en la enfermedad celiaca). Además, también se conoce la relación existente entre determinadas enfermedades autoinmunes y des-regulaciones en la composición de la microbiota intestinal (Adams y cols. (2008) IgG antibodies against common gut bacteria are more diagnostic for Crohn's Disease than IgG against mannan or flagellin. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 386-396).

El proceso de tolerancia frente a la microbiota intestinal está mediado, en gran parte, por dos tipos celulares que, embebidos en la mucosa intestinal, están encargados del correcto procesamiento y reconocimiento de los antígenos procedentes de la microbiota intestinal. Estos los linfocitos T y las células dendríticas (CDs). Las CDs son células fagocíticas especializadas en el procesamiento y la presentación de antígenos; en el caso de las CDs intestinales juegan un papel imprescindible en el reconocimiento de los microorganismos allí presentes, emitiendo pseudópodos entre los enterocitos del epitelio intestinal hacia el lumen (Rescigno y cols. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2, 361-367). Las CDs fagocitan las partículas bacterianas y las procesan, sufriendo una serie de cambios denominados maduración y mostrando esos antígenos bacterianos en su superficie, para que puedan ser reconocidos por otras células del sistema inmune. Este cambio, además, va acompañado de una serie de alteraciones fenotípicas en las CDs, como la producción de ciertas citoquinas. Las CDs son, a su vez, claves para la proliferación y diferenciación de los linfocitos T hacia células efectoras de tipo Th1 (inducen respuesta pro-inflamatoria), Th2 (inducen respuesta anti-inflamatoria) ó Th17 (intervienen en la protección de los tejidos superficiales contra las infecciones), o bien hacia células reguladoras (Treg) (Zhu y Pau (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–1569). En complementación a las CDs, los linfocitos T son las células responsables de la respuesta inmune celular.

Algunas cepas pertenecientes al grupo de bacterias del ácido láctico son consideradas como probióticos, ya que son capaces de modular favorablemente la composición de la microbiota intestinal, afectando favorablemente a la salud humana (Rijkers,G.T. y cols. (2010) Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J. Nutr.* 140, 671S-676S). En los últimos años, diversos grupos de investigación han ido acumulando evidencia científica que sugiere que ciertos componentes extracelulares podrían ser responsables de algunos de los efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos. Esto cobra más sentido si se tiene en cuenta que en condiciones normales, en los individuos sanos la microbiota no se encuentra en contacto directo con la capa de enterocitos y/o las CDs. Por el contrario la microbiota se encuentra embebida en la capa de mucus protectora que recubre la capa epitelial del intestino. Es por tanto factible que dichos efectos beneficiosos de los probióticos no se deban a la interacción directa de las bacterias con las CDs. Por el contrario los probióticos podrían ejercer su función produciendo ciertos componentes que sí puedan atravesar la capa de mucus facilitando su captación por las CDs. Entre estos componentes extracelulares podemos mencionar los exopolisacáridos, los ácidos teicoicos, los indoles y las proteínas de superficie y extracelulares (Lebeer y cols. (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 171-84). Estas últimas se definen como el grupo de proteínas que son secretadas durante el crecimiento bacteriano y que son liberadas al medio que las rodea (Sánchez y cols. (2008) Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. FEMS *Immunol. Med. Microbiol.* 54, 1-17). Actualmente, las proteínas extracelulares constituyen un campo de investigación activa para la identificación y caracterización de los mecanismos moleculares de acción de los probióticos.

Las proteínas extracelulares pueden ser divididas en dos grupos principales. El primero está compuesto por aquellas proteínas que tienen un péptido señal, localizado en su parte N-terminal, y que dirige a la pre-proteína a la maquinaria

de secreción, a través de la cuál es secretada al medio. El segundo grupo comprende aquellas proteínas que, además de un péptido señal, tienen dominios de unión a la superficie celular, siendo liberadas al medio durante el proceso de renovación de la pared bacteriana. Por último, algunos autores identifican un tercer grupo de proteínas extracelulares, compuesto por proteínas del metabolismo central, sin dominios de secreción, y para las cuales se desconoce el mecanismo responsable de su secreción al exterior celular.

Los sistemas de secreción de proteínas están altamente conservados dentro de la división Eubacteria. Dichos sistemas están particularmente bien caracterizados en bacterias Gram negativas, donde al menos se distinguen siete sistemas (tipos 1-6 y el sistema de las "argininas gemelas") (Sibbald y van Dijl (2009) Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis. Ed. Wooldridge, Caister Academic Press). En bacterias Gram positivas, grupo taxonómico que comprende a la mayor parte de cepas probióticas, las proteínas extracelulares serían exportadas por sistemas análogos.

Hasta la fecha, la bioinformática ha sido el útil de identificación de proteínas extracelulares en probióticos, y sólo una pequeña parte ha sido bien identificada o caracterizada experimentalmente. Entre las proteínas extracelulares producidas por las bifidobacterias, podemos mencionar el inhibidor de serín-proteasas (serpina), producido por distintas especies de bifidobacterias (Turroni y cols. (2010) Characterization of the serpin-encoding gene of *Bifidobacterium breve* 210B. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3206-3219). Esta proteína inhibe eficientemente tanto las elastasas secretadas por el páncreas exocrino como por los neutrófilos, células inmunitarias implicadas en procesos inflamatorios. Por esta razón, se ha postulado que la serpina podría ser la responsable de alguno de los efectos anti-inflamatorios de las bifidobacterias. También se ha sugerido que proteínas secretadas por una cepa de *Bifidobacterium breve* sería capaz de producir factores solubles, muy probablemente pequeños péptidos, que tras interaccionar con las CDs reducirían los procesos inflamatorios a nivel del epitelio intestinal (Heuvelin y cols. (2009) Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by *Bifidobacterium breve* soluble factors. *PLoS One.* 4:e5184).

Estos trabajos son solamente ejemplos de cómo el proceso de comunicación intercelular entre bacterias y células inmunes del sistema innato, mediaría una serie de respuestas fisiológicas dirigidas a regular la homeostasis inmunológica de nuestra mucosa intestinal, y por ende de nuestro organismo. Parte de este proceso, como muestran los resultados descritos en la presente invención, podrían estar mediados por péptidos codificados en el interior de las principales proteínas secretadas por las bacterias del ácido láctico presentes en nuestro tracto gastrointestinal.

Con respecto a patentes similares disponibles en las bases de datos, podemos citar la patente EP95900421.9 la cual tiene como objeto de protección unas composiciones que se unen específicamente a células cancerosas colorrectales y procedimiento de uso de las mismas. En este documento se describe el uso de otros péptidos ST, en este caso derivados de una toxina termoestable producida por una cepa de la bacteria *Escherichia coli*, cuya secuencias no corresponden con la secuencia del péptido descrito en esta invención. . Aunque este documento define los "péptidos ST" como los péptidos de unión a receptor de ST de entre 13 y 25 aminoácidos, estos péptidos proceden de *E. coli* y se encuentran comprendidos en compuestos conjugados, los cuales también comprenden un resto activo radioestable, para ser capaces de dirigirse específicamente a células de cáncer colorrectal metastatizadas.

Por otro lado, WO2009138092, hace referencia a la cepa 299v de *Lactobacillus plantarum* y se resaltan las propiedades probióticas de la cepa *Lb. plantarum* DSM 21379, describiendo su uso en la elaboración de un alimento funcional y de un medicamento para mejorar la inmunidad celular. Entre las funciones que se destacan de este microorganismo, está la de inducir la producción de citoquinas para mejorar el sistema inmune del animal. Aunque este documento describe que *Lb. plantarum* produce citoquinas para mejorar el sistema inmune, dichas citoquinas son pro-inflamatorias (IL-6).

Por tanto, actualmente existe la necesidad de identificar un péptido ST derivado de proteínas secretadas por bacterias ácido lácticas, con función tanto inmunomoduladora como anti-inflamatoria para el tratamiento de enfermedades relacionadas por una des-regulación de la microbiota intestinal, enfermedades inflamatorias y/o enfermedades donde la tolerancia oral se encuentra comprometida.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCIÓN

En esta invención se describe la secuencia del péptido ST, codificado dentro de una de las proteínas secretadas por una bacteria del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus plantarum* (hasta la fecha sin función conocida), dicho péptido de 30 kDa contiene un fragmento sin puntos de corte para las proteasas intestinales más importantes. También se caracteriza por tener un contenido en serina y treonina de, al menos, un 50%. Si este péptido es puesto en contacto con CDs obtenidas tanto de sangre como de biopsias intestinales humanas, es capaz de modularlas hacia un fenotipo regulador donde se bloquea la producción de IL-12 (interleuquina pro-inflamatoria característica de células presentadoras de antígenos) y se expande la producción de IL-10 (citocina anti-inflamatoria a través del bloqueo de la síntesis de citocina pro-inflamatorias por parte de otros tipos celulares inmunes, como los linfocitos T). Dichas CD tratadas con el péptido ST adquieren asimismo una funcionalidad diferente ya que los linfocitos T que estimulan adquieren un perfil migrador preferencialmente dirigido a la piel con un perfil de citocinas no pro-inflamatorio. Este mecanismo de acción contribuye activamente al mantenimiento de la homeostasis intestinal no primando los mecanismos de la tolerancia inmunológica sino por el contrario de la ignorancia inmunológica. Así, las CDs maduradas con el péptido ST en el intestino favorecen la migración secundaria de las células efectoras (linfocitos T) a la piel

impidiendo por tanto el establecimiento de una respuesta inmune activa frente a la flora comensal en el tracto gastrointestinal.

En definitiva, el péptido ST favorece los mecanismos de la homeostasis intestinal a través de su acción sobre las CDs. Dado que es capaz de bloquear una interleuquina anti-inflamatoria (IL-12) y de aumentar la síntesis de una interleuquina anti-inflamatoria (IL-10), el péptido ST podría ser utilizado en inmunoterapia, en el marco de ciertas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, en las que se conoce que existe una respuesta inmune anormal a la microbiota intestinal además de en otras patologías donde los mecanismos de la tolerancia oral frente a otros antígenos se encuentra perdida. Esto sentaría la base científica para la creación de toda una serie de alimentos funcionales en los que se incluirían aquellas moléculas que, producidas por los probióticos, son las responsables de su acción beneficiosa sobre la salud humana.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención hace referencia a un péptido ST con propiedades inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias, caracterizado porque:

a) es secretado por una bacteria del género *Lactobacillus,*

b) su secuencia aminoacídica tiene un contenido de entre el 30-60% de los aminoácidos serina y treonina, y

c) comprende un fragmento de al menos 30 kDa sin puntos de corte para al menos una proteasa intestinal.

En la presente invención, el término “péptido ST” se refiere a un péptido preferentemente de 73 aminoácidos, y con propiedades inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias, que es segregado preferentemente por una bacteria *Lactobacillus*, preferentemente por *Lactobacillus plantarum*, más preferentemente por las cepas *Lb. plantarum* NCIMB 8826, *Lb. plantarum* 299V, y *Lb. plantarum* BMCM12, cuya secuencia aminoacídica tiene un contenido de al menos el 50% de los aminoácidos serina y treonina, y comprende un fragmento de al menos 30 kDa sin puntos de corte para al menos una proteasa intestinal. Este péptido puede presentar al menos entre un 80 - 100% de homología con SEQ ID No: 1, o su ortólogo.

En la presente invención, la expresión “con propiedades inmunomoduladoras” se refiere a su capacidad para modular la respuesta de células del sistema inmune humano como las células dendríticas, siendo éstas, a su vez, capaces de modular la función de otras células inmunes como son los linfocitos T. Esta modulación de la respuesta inmune comprende el bloque.

En la presente invención, la expresión “con propiedades antiinflamatorias” se refiere a su capacidad de inducir la producción de interleuquina 10, una potente citocina anti-inflamatoria, así como de bloquear la producción de interleuquina 12, una citocina de naturaleza pro-inflamatoria, en células dendríticas aisladas tanto de sangre periférica como de mucosa intestinal humana. Además, linfocitos T madurados en presencia de dichas células dendríticas también adquirieron un perfil de producción de citoquinas no pro-inflamatorio.

En una realización preferente dicha bacteria *Lactobacillus* es *Lactobacillus plantarum*. Más preferentemente, la cepa de dicha bacteria *Lactobacillus plantarum* se selecciona de entre el siguiente grupo de cepas: *Lb. plantarum* NCIMB 8826, *Lb. plantarum* 299V, y *Lb. plantarum* BMCM12.

En una realización preferente de la presente invención, dicho péptido ST se caracteriza porque su secuencia aminoacídica tiene al menos entre un 80 - 100% de homología con SEQ ID No: 1. Preferentemente dicho péptido ST se caracteriza porque su secuencia aminoacídica tiene un 95% de homología con SEQ ID No: 1. Más preferentemente dicho péptido ST se caracteriza porque su secuencia aminoacídica es SEQ ID No: 1, o su ortólogo.

En la presente invención el término “homología” se refiere al concepto de “homología de secuencia”, refiriéndose al grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos.

En la presente invención el término “ortólogo” se refiere a dos cadenas de aminoácidos o nucleótidos, procedentes de dos organismos distintos, que comparten un alto grado de homología.

En una realización preferente de la presente invención, dicho péptido ST se caracteriza porque la proteasa intestinal se selecciona de entre el siguiente grupo: pepsina, tripsina, quimiotripsina, y combinaciones de las mismas.

La presente invención también hace referencia al uso de dicho péptido ST en un método de tratamiento y/o prevención de una afección intestinal, dicho método se caracteriza por comprender la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST definido anteriormente, para activar el proceso de ignorancia o tolerancia inmunológica hacia las bacterias comensales del intestino de dicho paciente.

En la presente invención el término “afección intestinal” se refiere a cualquier dolencia intestinal donde el sistema inmune esté implicado bien en su origen o en su tratamiento.

En la presente invención el término “tolerancia inmunológica” se refiere al conjunto de procesos inducidos por el que los

cuales el sistema inmune no responde frente a un antígeno, propio o extraño.

En la presente invención, el término “ignorancia inmunológica” se refiere a su capacidad para promover los mecanismos de la homeostasis intestinal promoviendo no sólo una tolerancia inmunológica (diferenciando las células dendríticas aisladas tanto de sangre periférica como de mucosa intestinal humana hacia un perfil regulador de citocinas) sino también primando a los linfocitos T que estimulan con una capacidad de migración aumentada hacia tejidos cutáneos donde no estarán expuestos a los antígenos microbianos del tracto gastrointestinal.

En la presente invención la expresión “bacterias comensales del intestino del paciente” se refiere al conjunto de bacterias que habitan en el tracto gastrointestinal humano

En una realización preferente de la presente invención dicha afección intestinal es una enfermedad inflamatoria, seleccionada entre una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), o una enfermedad celiaca.

En una realización aún más preferente de la presente invención dicha enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se selecciona entre el siguiente grupo: la enfermedad de Chron, la Colitis ulcerosa y la Pouchitis.

En una realización preferente de la presente invención dicha afección intestinal está provocada por una enfermedad autoinmune o una enfermedad causada por la des-regulación en la composición y/o actividad/metabolismo de la microbiota intestinal.

En una realización preferente de la presente invención dichas propiedades inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias se manifiestan respectivamente porque

la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST comprende:

a) inducir en las células dendríticas de dicho paciente la producción de una citoquina anti-inflamatoria y homeostática, preferentemente interleuquina 10 (IL-10), y/o

b) bloquear en las células dendríticas de dicho paciente la producción de una citoquina pro-inflamatoria, preferentemente pro-inflamatoria interleuquina 12 (IL-12), cuando ésta se encuentra presente, además de otras citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6, con una alta relevancia en enfermedad inflamatoria intestinal.

En una realización aún más preferente el método de tratamiento y/o prevención definido anteriormente se caracteriza porque dichas células dendríticas inducen a su vez la maduración de linfocitos T los cuales:

a) adquieren un perfil de migración a piel, y/o

b) adquieren un perfil de producción de citoquinas no pro-inflamatorias.

Preferentemente el perfil de migración a piel definido en a) comprende un descenso en la expresión del marcador de migración a mucosa intestinal integrina β7 y un aumento en la expresión del marcador de migración a piel CLA. Preferentemente el perfil de producción de citoquinas no pro-inflamatorias definido en b) comprende un descenso en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias IFNγ e interleuquina 17 (IL-17).

En otra realización preferente de la presente invención, dicha administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST, se caracteriza porque dicho péptido ST se encuentra contenido en un alimento funcional (probiótico) o bien en una composición farmacéutica, preferentemente en forma de cápsula.

Otro aspecto protegido por la presente invención concierne a un alimento funcional, caracterizado por comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST definido anteriormente.

En la presente invención el término “alimento funcional” se refiere al conjunto de alimentos que, más allá de sus características nutricionales, confieren un beneficio en la salud del consumidor o ayudan a no contraer enfermedades.

Otro aspecto protegido por la presente invención concierne una composición, preferentemente farmacéutica, caracterizada por comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST definido anteriormente.

En la presente invención el término “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla de principios activos y excipientes con un formato adecuado para su uso en humanos.

La presente invención también hace referencia al uso del alimento funcional o la composición definidos anteriormente, para activar el proceso de tolerancia inmunológica hacia las bacterias comensales del intestino del paciente.

La presente invención también hace referencia al uso de dicho péptido ST en una aplicación cosmética.

En la presente invención el término “aplicación cosmética” se refiere al uso en cosméticos orientados a mejorar el estado de la piel humana, notablemente la del rostro.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

AGRADECIMIENTOS

Parte del trabajo de esta patente ha sido posible gracias a la financiación obtenida mediante la beca nº235993 del Séptimo Programa Marco de la Comunidad Europea (FP7/2007-2013).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Gel de proteína en condiciones desnaturalizantes en el que se muestran las proteínas totales y secretadas por 3 cepas de *Lactobacillus plantarum*. Calle 1-3: proteínas totales de las cepas NCIMB 8826, 299v y BMCM12. Calle 4: proteínas presentes en el medio de cultivo. Calles 5-7; proteínas secretadas por las cepas NCIMB 8826, 299v y BMCM12. MM: marcador de peso molecular de proteínas (kDa).

Fig.2. A. Zona rica en serinas y treoninas presente en la zona central de la proteína D1 identificada como SEQ ID NO: 2, comprendida entre las posiciones aminoacídicas 70 y 135, y **B.** secuencia aminoacídica del péptido ST identificada como SEQ ID NO: 1, descrito en la presente patente. Los aminoácidos subrayados en SEQ ID NO: 1 representan los cambios del péptido ST respecto a la zona central de la proteína D1 identificada como SEQ ID NO: 2.

Fig.3. Puntos de corte teóricos de las principales proteasas intestinales sobre el fragmento central de la proteína D1, identificada como SEQ ID NO: 2. Como puede observarse (indicado con una flecha), el fragmento ST no contiene puntos de corte teóricos. **A.** Representa el fragmento de la proteína D1 entre las posiciones aminoacídicas 61 y 120, identificado como SEQ ID NO: 3, y **B.** representa el fragmento de la proteína D1 entre las posiciones aminoacídicas 121 y 180, identificado como SEQ ID NO: 4.

Fig.4. Migración del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 purificado en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Fig.5. a) Producción de marcadores de migración a mucosa intestinal (integrina β7) y a piel (CLA) en células dendríticas enriquecidas a partir de sangre humana (LDCs). Las condiciones testadas fueron las basales (ausencia de señalización), 0.0, 0.1, 1.0 o 10 microgramos/mililitro del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1. b) el ensayo realizado con este péptido no modifica ni los marcadores de migración a tejidos (β7 y CLA), ni las moléculas del MHC de tipo II (HLA-DR) ni ciertas moléculas co-estimulatorias (CD40) o de activación (CD83) en células dendríticas enriquecidas de sangre humana. El estímulo con lipopolisacárido (LPS) fue usado como un control de una estimulación con un componente bacteriano pro-inflamatorio.

Fig.6. Modificación del perfil de producción de citoquinas medido en el citoplasma de células dendríticas enriquecidas a partir de sangre humana inducido por distintas concentraciones del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1. El estímulo con LPS fue usado como un control de una estimulación con un componente bacteriano pro-inflamatorio. IL-6: interleuquina 6, TGFβ: factor de crecimiento transformante beta, IL-10: interleuquina 10, IL-12: interleuquina 12.

Fig.7. Modificación del perfil de producción de las citoquinas IL-10 e IL-12 medido en el citoplasma de células dendríticas enriquecidas a partir de biopsias de mucosa de colon (intestinal DC).

Fig.8. De izquierda a derecha, representaciones obtenidas mediante citometría de flujo que representa poblaciones de células T estimuladas con células dendríticas alogénicas. Panel izquierdo: detección de células viables mediante la técnica “forward side scatter”. Panel central: identificación del marcadorCD3. Panel derecho: las células T estimuladas fueron identificadas por perder la tinción para CFSE derivada de la división celular.

Fig.9. Diagramas de citometría de flujo que representan cambios inducidos en células T estimuladas por células dendríticas enriquecidas de sangre (LDC) y expuestas al péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (LDC BP) o a lipopolisacárido (LPS LDC). En todos los casos se comparó con los cambios producidos en las células T en reposo (resting T-cells), y con la utilización de LDCs no estimuladas (basal LDC). A) Cambios en los niveles del marcador de migración a mucosa intestinal integrina β7 inducido por distintas concentraciones del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (BP LDC) y de lipopolisacárido (LPS LDC). B) Cambios en los niveles del marcador de migración a piel CLA inducido por distintas concentraciones del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (BP LDC) y de lipopolisacárido (LPS LDC). C) Representación de los resultados mediante histograma de barras de 3 experimentos independientes.

Fig.10. Diagramas de citometría de flujo que representan cambios en la producción de las citocinas IL-10, TGFβ, IFNγ e IL-17 en linfocitos T estimulados por células dendríticas enriquecidas a partir de sangre (LDC)y pulsadas con distintas concentraciones del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (BP LDC) o lipopolisacárido (LPS LDC). En todos los casos se comparó con los cambios producidos en las células T en reposo (resting T-cells), y con la utilización de LDCs no estimuladas (basal LDC).

Fig.11. Representación gráfica de los datos de la figura 10 en la que se muestran los valores de 3 experimentos independientes y sus desviaciones.

Fig.12. Diagramas de citometría de flujo que representan cambios en la producción de las citocinas TGFβ, IL-10, IL-17 e IFNγ en linfocitos T estimulados por células dendríticas enriquecidas a partir de biopsias de colon (gut DC) en ausencia de estimulación (basal gut DC) (panel central) o pulsadas previamente con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (peptide gut DC) (panel inferior). El panel superior representa la producción de las mismas citocinas en células T en reposo (resting T cells).

Fig.13. Diagramas de citometría de flujo que representan cambios en la producción de los marcadores de migración β7 (mucosa intestinal) y CLA (mucosa epitelial) en linfocitos T estimulados con células dendríticas enriquecidas a partir de biopsias de colon (gut DC) en ausencia de estimulación (basal gut DC) (panel central) o pulsadas previamente con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (peptide gut DC) (panel inferior). El panel superior representa la producción de los mismos marcadores de migración en células T en reposo (resting T cells).

Fig.14. Diagramas de citometría de flujo que representa la producción de IL-10 e IL-12 en un donante cuyas células dendríticas de la mucosa del colon presentaban una producción anómala de IL-12. Estas células dendríticas se incubaron en presencia del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (+BP). En comparación a las condiciones basales (basal) la presencia del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1fue capaz de inducir la producción de IL-10 y de bloquear la producción de IL-12

BIBLIOGRAFÍA

Adams y cols. (2008) IgG antibodies against common gut bacteria are more diagnostic for Crohn's Disease than IgG against mannan or flagellin. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 386-396

Feng y Elson (2010) Adaptive immunity in the host – microbiota dialog. *Muc. Immunol.* 4, 15-21

Lebeer y cols. (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 171-84

Rescigno y cols. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2, 361-367

Rijkers,G.T. y cols. (2010) Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J. Nutr.* 140, 671S-676S

Sánchez y cols. (2008) Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. FEMS *Immunol. Med. Microbiol.* 54, 1-17

Sibbald y van Dijl (2009) Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis. Ed. Wooldridge, Caister Academic Press

Turroni y cols. (2010) Characterization of the serpin-encoding gene of *Bifidobacterium breve* 210B. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3206-3219

Zhu y Pau (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–1569

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Identificación de las proteínas secretadas por *Lb. plantarum* y del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1

Lb. plantarum es una bacteria del ácido láctico mesófila que puede ser aislada de un gran número de alimentos fermentados, incluyendo productos lácteos y vegetales (Tallon y cols. (2003) Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. Microbiol.* 154, 705-712). La capacidad de supervivencia de algunas cepas a las condiciones del tracto gastrointestinal humano ha hecho que algunos investigadores se hayan interesado por su potencial probiótico. Así, se ha demostrado científicamente los beneficios de algunas cepas de *Lb. plantarum* en la salud humana, siendo comercializadas actualmente como probióticos (como es el caso de la cepa 299v) (de Vries, y cols. (2006) *Lactobacillus plantarum*- survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. Int. Dairy J. 16, 1018-1028).

Actualmente, existe un creciente interés en el estudio de las proteínas secretadas por bacterias probióticas, al ser éstas potenciales mediadores de la comunicación intercelular entre bacterias y células del sistema inmune del hospedador. Como puede verse en la figura 1, en la que se muestran las principales proteínas secretadas por *Lb. plantarum* NCIMB

8826, *Lb. plantarum* 299v y *Lb. plantarum* BMCM12 (calles 5, 6 y 7), existe una relativa similitud entre las proteínas secretadas por diferentes miembros de la especie *Lb. plantarum*. La secuencia del péptido ST, cuya secuencia se muestra en la figura 2 identificada como SEQ ID No: 1, deriva de la zona central de la proteína denominada D1 (Número de identificador del GenBank gi|28270057) identificada como SEQ ID No: 2, con algunas modificaciones e inclusiones de aminoácidos que aparecen subrayadas en la SEQ ID NO: 1 (figura 2). Esta zona se caracteriza por su riqueza en los aminoácidos serina y treonina, de la que deriva su nombre, y se caracteriza por la ausencia de puntos de corte para algunas de las proteasas más importantes del tracto gastrointestinal (pepsina, tripsina y quimotripsina) (figura 3).

Clonación y purificación del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (verificación de la ausencia de lipopolisacárido)

La secuencia de ADN codificante para el fragmento ST, (correspondiente a la secuencia de aminoácidos señalada en la figura 2 como SEQ ID NO: 2), fue clonada en *Lactococcus lactis* y purificada en columna de afinidad de níquel de acuerdo a protocolos estándar. Este péptido es secretado al sobrenadante de cultivo, de donde puede ser aislado y purificado, y se caracteriza por formar artefactos en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), migrando a un tamaño correspondiente a unos 100 kDa (figura 4). La secuencia del amino terminal del péptido fue verificada mediante degradación de Edman.

Regiones ricas en serina y treonina pueden ser encontradas en proteínas codificadas de muchas otras bacterias del ácido láctico y en géneros del tracto gastrointestinal, por lo que las conclusiones derivadas de la presente invención podrían ser aplicadas a péptidos ST derivados de otras secuencias de otros microorganismos.

Interacción del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 con células dendríticas

Dado que los péptidos ST, liberados por las proteasas intestinales o por las proteasas de las células presentadoras de antígenos, pueden ser capaces de influir en la función del sistema inmune innato asociado a mucosas, procedimos a estudiar su interacción con las principales células presentadoras de antígenos, las CDs. En primer lugar, se verificó la ausencia de lipopolisacárido en las muestras de péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 mediante el kit cromogénico de Genscript. Nuestra hipótesis de partida ha sido considerar que el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1, producido en el ambiente intestinal o ingerido a través de los alimentos, podría interaccionar con las CDs de la mucosa intestinal, afectando así a la función inmune.

Ejemplo 1.- Interacción del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 con células dendríticas procedentes de sangre.

1.1.Material y métodos

Las células dendríticas fueron obtenidas de pacientes sanos que no presentaban ni enfermedades autoinmunes, ni inflamatorias ni alergias ni tumores malignos. Estos dieron su consentimiento por escrito para utilizar su sangre con fines científicos. Las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas por centrifugación diferencial en Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, UK). La fracción celular LDC (células de baja densidad en Inglés), fue obtenida mediante una centrifugación overnight en la solución NycoPrepeTM. Las células presentes en esta fracción LDC fueron HLA-DR positivas en el 98-100% de los casos, con características morfológicas características de las CDs (Ng, y cols (2009). A novel population of human CD56+ human leucocyte antigen D-related (HLA-DR+) colonic lamina propria cells is associated with inflammation in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 158, 205-218).

Medio millón de LDCs por mililitro fueron cultivadas en medio completo (Dutch modified RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) conteniendo 100U/mL penicilina/estreptomicina, L-glutamina 2mM, gentamicine 50U/mL (Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino al 10% (v/v) (TCS cellworks, Buckingham, UK)). Estos cultivos se realizaron en presencia del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 purificado en concentraciones de 10µg/mL, 1µg/mL y 0.1µg/mL) y de LPS (100ng/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) como control positivo. Los resultados se compararon con cultivos paralelos sin péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 ni LPS añadido, actuando como controles negativos.

Para los distintos experimentos, el marcado de las células con los diferentes anticuerpos (tabla 1) se realizó en PBS suplementado con EDTA 1mM y acida sódica al 0,02% (p/v) (buffer FACS). El marcado se realizó durante 20 minutos en hielo y en oscuridad. Las células se lavaron posteriormente con buffer FACS y se fijaron con paraformaldehido al 1% (v/v) en solución salina, y almacenadas a 4ºC hasta la adquisición de datos en el citómetro de flujo. Como controles negativos se usaron anticuerpos pareados para isotipo sin especificidad, marcados con el mismo fluorocromo y que fueron obtenidos de la misma casa comercial (controles de isotipo).

Los datos de citometría de flujo fueron obtenidos en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences), y los datos analizados con el programa WinList 5.0 (Verity, ME, US). La proporción de muestras positivas para un determinado marcador fueron determinadas en referencia a controles de isotipo. Para la cuantificación por histogramas se realizó un análisis con el software WinList, en el cual el histograma de tinción isotípico se restó del histograma de tinción específico using una substracción normalizada *superenhanced* D_{max} (SED) (Bagwell, C.B. (2005). Hyperlog-a flexible log-like transform for negative, zero, and positive valued data. Cytometry. 64, 34-42).

Tinción intracelular de citocinas.

Las CDs fueron cultivadas durante 4 horas en presencia/ausencia de monensina. Posteriormente fueron teñidas para los marcadores de superficie como se describió previamente. A continuación fueron fijadas con LeucopermA, y permeabilizadas con LeucopermB antes de añadir los anticuerpos de tinción intracelular. Tras la incubación las CDs se lavaron en buffer FACS, se fijaron y fueron adquiridas como se describió previamente. El análisis se realizó mediante la substracción SED detallada previamente donde el histograma de cada citocina de las CDs que no habían sido incubadas con monensina se restaron del histograma de cada citocina de las CDs que había sido incubadas en ausencia de monensina. Este protocolo ha sido ampliamente validado por nuestros colaboradores (Hart y cols., (2005) Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 129, 50-65) y permite cuantificar cambios en la producción natural de citocinas por parte de las CDs en ausencia de estímulos externos como PMA y/o ionomicina. Mediante este abordaje no se determina el contenido intracelular de cada citocina. Por el contrario se determinan los cambios inducidos en la producción de citocinas en una ventana temporal de 4 horas (el tiempo de incubación con monensina) independientemente del contenido inicial de citocinas.

1.2.Resultados

Como puede verse en la figura 5 (panel A), el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 no produjo cambios en los marcadores de migración de las CDs enriquecidas de sangre periférica (Integrina β7, marcador de mucosa intestinal y CLA, marcador de piel). El péptido tampoco produjo cambios ni en la inducción de moléculas MHC de tipo II (HLA-DR) ni de ciertas moléculas co-estimuladoras (CD40) o de activación (CD83) (figura 5, panel B). Como puede apreciarse en ésta última, el LPS (control positivo) sí indujo una sobre-expresión en todas ellas.

En cuanto a los cambios en la producción de citoquinas (intracelulares) inducidos por el péptido en LDCs, éste no afectó a la molécula reguladora TGFβ, implicada en el control del crecimiento celular, en la proliferación celular, y en procesos de diferenciación y apoptosis. En cambio, el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 indujo una reducción en la síntesis de IL-6 (inductora de la generación de células Th17) e IL-12 (pro-inflamatoria), y un incremento en la síntesis de IL-10 (anti-inflamatoria y homeostática) (Figura 6).

Como conclusión, la presencia del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 en células dendríticas enriquecidas a partir de sangre humana (LDCs), hace que éstas adquieran un perfil de producción de citoquinas regulador, reduciendo la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 y aumentando la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. La reducción en la síntesis de IL-6, con la consecuente reducción teórica en la síntesis de células T tipo Th17, es también interesante puesto que en el marco de ciertas enfermedades autoinmunes e inflamatorias se observa un aumento de este tipo celular (Stockinger y Veldhoen (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 281–286).

Ejemplo 2.- Interacción del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 con células dendríticas procedentes de biopsia de mucosa intestinal.

Ya que el sitio de acción del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 sería, en principio, la mucosa intestinal, decidimos tratar de validar los experimentos descritos en el ejemplo 1 utilizando CDs aisladas de dicha localización.

2.1.Material y métodos

Las biopsias procedentes del colon fueron obtenidas de tres pacientes sanos, quienes consintieron por escrito a participar en este estudio (una mujer y dos hombres, rango de edad 30-58 años). Estos pacientes presentaban, tanto macroscópica como histológicamente, intestinos normales, y habían sido inspeccionados tras informar cambios en el tránsito intestinal o sangrado rectal. Una vez obtenidas, las biopsias fueron recogidas en medio completo enfriado a 4ºC y procesadas antes de la primera hora a partir de su extracción. Las biopsias se incubaron en *Hanks's balanced salt solution* (HBSS) (Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK) conteniendo ditiotreitol 1mM (DTT) (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos. Seguidamente, se incubaron en una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1mM con el fin de eliminar tanto las células epiteliales como la capa de mucus y sus bacterias asociadas. Las células mononucleadas de la lámina propria fueron extraídas con una digestión en presencia de colagenasa D 1mg/mL (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK) en medio completo, que no afecta ni al fenotipo ni a la función de las CDs (Hart y cols. (2005) Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 129, 50-65). Las suspensiones celulares de células mononucleadas de la lámina propria (200000 células/mL) fueron incubadas durante 4 horas en presencia del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 purificado (10µg/mL) y en presencia/ausencia, a su vez, de monensina, con sus correspondientes controles negativos. Las CDs de la lámina propria fueron identificadas mediante citometría de flujo por la presencia de los marcadores HLA-DR+ y CD3-CD14-CD16-CD19-CD34- (Hart y cols. (2005) Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 129, 50-65).

El resto de metodologías seguidas en este ejemplo fueron las mismas que en el apartado 1 del ejemplo 1.

2.2 Resultados

Utilizando el modelo de CDs intestinales, pudo confirmarse los dos puntos más interesantes descritos en el ejemplo 1, el incremento de la producción de IL-10 y el no incremento en la producción de IL-12. En este punto ha de tenerse en

cuenta que, las CDs aisladas de la mucosa intestinal de individuos sanos presentan niveles de producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 muy bajos (figura 7).

Ejemplo 3.- Interacción de células dendríticas obtenidas de sangres maduradas con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 con linfocitos T

3.1.Material y métodos

Los linfocitos T fueron obtenidos a partir de células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs). Las PBMCs, obtenidas de sangre recién extraída tal y como se describe en el ejemplo 1, fueron resuspendidas en buffer MiniMACs (PBS suplementado con seroalbúmina bovina 0,5% (p/v) y EDTA 2mM). Esta suspensión se enriqueció en células T mediante eliminación de las células CD14 positivas, CD19 positivas y HLA-DR positivas con bolitas inmuno-magnetizadas (Miltenyi Biotech, Bisley, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como media de todas las extracciones/enriquecimientos, se obtuvo un porcentaje de células T de 94.91%±1.06 (media±desviación estándar).

Las células T se marcaron con ester de 5-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE, Invitrogen Ltd, UK) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células T así marcadas ($4x10^5$ células por pocillo), se incubaron durante 5 días con CDs al 0, 1, 2 o 3% en placas de microtítulo con fondo en forma de U. Las células T en proliferación fueron identificadas y cuantificadas mediante citometría de flujo como aquellas que contenían poca cantidad de CFSE ($CFSE^{low}$) (Figura 8).

El resto de protocolos de citometría de flujo se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 1 del ejemplo 1.

3.2.Resultados

La fracción de células T que no se puso en contacto con CDs (células T en reposo), presenta un perfil de "*homing*" (marcadores que indican a qué tejido se dirigen) y de producción de interleuquinas (IL-10, TGFβ, IFNγ, IL-17) característico de cada donante. Como era de esperar, tanto los valores absolutos de marcadores de "*homing*", como los de producción de citoquinas producidos por LCDs (ejemplo 1) no condicionadas ni con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 ni con LPS, también fue distinta en cada donante.

A pesar de ello, las CDs incubadas previamente con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 o con el LPS (control positivo), indujeron siempre el mismo perfil de producción de citoquinas y de marcadores de "*homing*" en las células T de los diferentes donantes. Centrándonos en las CDs incubadas con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1, éstas indujeron en los linfocitos T un descenso en el marcador de migración a mucosa intestinal integrina β7, mientras que, en cambio, aumentó considerablemente la cantidad de marcador CLA (marcador de migración a piel) (Figura 9). Por tanto, las CDs enriquecidas de sangre incubadas en presencia del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1, imprimen en los linfocitos T marcadores de migración a piel. Desde un punto de vista inmunológico esto puede interpretarse como un mecanismo de ignorancia inmune a los antígenos presentes en el tracto gastrointestinal. En este sentido, las células T, una vez en la piel, nunca encontrarían el antígeno contra el que han sido seleccionadas en la mucosa intestinal, siendo por tanto inactivas.

Además, el perfil de producción de citoquinas en estas mismas células T (co-incubadas con DCs que previamente habían sido incubadas con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1), difirió en el sentido de que tanto la producción de IFNγ como la de IL-17 disminuyó (figuras 10 y 11). Ambas citoquinas son pro-inflamatorias y, en el caso de la IL-17 (células Th17), se sabe que su producción por parte de las células T es mayor en de ciertas enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Por tanto, los linfocitos T madurados con CDs condicionadas por el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 adquieren un perfil de producción de citoquinas no pro-inflamatorio y un perfil de migración a piel.

Ejemplo 4.- Interacción de células dendríticas obtenidas de mucosa intestinal maduradas con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 con linfocitos T vírgenes

Este ejemplo es igual que el ejemplo anterior, pero en este caso se utilizaron CDs aisladas de mucosa intestinal. Como puede verse en la figura 12, las CDs intestinales ya son "homeostáticas" en el sentido que el perfil de citoquinas que imprimen en las células T es inducir IL-10 (anti-inflamatoria), mientras que el resto de interleuquinas no aumenta (TGFβ, IL-17 e IFNγ). Las CDs incubadas con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1, inducen en las células T un aumento aún mayor de la producción de IL-10 y en la producción de TGFβ (figura 12c).

Por último, y al igual que en el ejemplo anterior, las CDs condicionadas por el péptido inducen un mayor número de linfocitos que expresan el marcador de migración a piel (figura 13) por lo que, una vez más, se demuestra que el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 estaría favoreciendo el proceso de ignorancia inmune.

Ejemplo 5. Uso potencial del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 en enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades autoinmunes con manifestaciones cutáneas y cosmética.

Uno de los donantes que consintió por escrito a donar una biopsia de su mucosa intestinal del colon para nuestros experimentos, presentaba unas CDs que producían unos niveles inusualmente elevados de IL-12, la interleuquina pro-

inflamatoria clásica de las células presentadoras de antígenos. Como puede verse en la figura 14, el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 abolió completamente la producción de IL-12 en estas células dendríticas, así como incrementó la producción de la interlequina anti-inflamatoria IL-10.

A pesar de ser un único ejemplo, planteamos que el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 definido anteriormente podría ser incluido en programas de inmunoterapia en el marco tanto de la enfermedad inflamatoria intestinal y otras enfermedades inflamatorias, como en el marco de enfermedades autoinmunes que cursen con síntomas inflamatorios.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido ST con propiedades inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias, caracterizado porque:

a) es segregado por una bacteria *Lactobacillus*,

b) su secuencia aminoacídica tiene un contenido de al menos el 50% de los aminoácidos serina y treonina, y

c) comprende un fragmento de al menos 30 kDa sin puntos de corte para al menos una proteasa intestinal.

2. El péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque la bacteria *Lactobacillus* es *Lactobacillus plantarum.*

3. El péptido según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la cepa de *Lactobacillus plantarum* se selecciona de entre el siguiente grupo: *Lb. plantarum* NCIMB 8826, *Lb. plantarum* 299V, y *Lb. plantarum* BMCM12.

4. El péptido según las reivindicaciones 1 y 3, caracterizado porque su secuencia aminoacídica tiene al menos entre un 80 - 100% de homología con SEQ ID No: 1.

5. El péptido según las reivindicaciones 1 - 4, caracterizado porque su secuencia aminoacídica es SEQ ID No: 1, o su ortólogo.

6. El péptido según las reivindicaciones 1 - 5, caracterizado porque la proteasa intestinal se selecciona de entre el siguiente grupo: pepsina, tripsina, quimiotripsina, y combinaciones de las mismas.

7. Un método de tratamiento y/o prevención de una afección intestinal, caracterizado por comprender la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST definido en las reivindicaciones 1 - 6, para activar el proceso de tolerancia inmunológica hacia las bacterias comensales del intestino de dicho paciente.

8. El método de tratamiento y/o prevención según la reivindicación 7, caracterizado porque la afección intestinal es una enfermedad inflamatoria seleccionada entre una enfermedad inflamatoria intestinal, o una inflamación celiaca.

9. El método de tratamiento y/o prevención según la reivindicación 8, caracterizado porque la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona entre el siguiente grupo: la enfermedad de Chron, la colitis ulcerosa y la pouchitis.

10. El método de tratamiento y/o prevención según la reivindicación 7, caracterizado porque la afección intestinal está provocada por una enfermedad autoinmune o una enfermedad causada por la des-regulación en la composición de la microbiota intestinal.

11. El método de tratamiento y/o prevención según las reivindicaciones 7 – 10, caracterizado porque la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST comprende:

a) inducir en las células dendríticas de dicho paciente la producción de una citoquina anti-inflamatoria y homeostática, y/o

b) bloquear en las células dendríticas de dicho paciente la producción de una citoquina pro-inflamatoria.

12. El método de tratamiento y/o prevención según la reivindicación 11, caracterizado porque la citoquina anti-inflamatoria y homeostática es la interleuquina 10.

13. El método de tratamiento y/o prevención según las reivindicaciones 11 – 12, caracterizado porque la citoquina pro-inflamatoria es la interleuquina 12.

14. El método de tratamiento y/o prevención según las reivindicaciones 11 – 13, caracterizado porque dichas células dendríticas inducen a su vez la maduración de linfocitos T los cuales:

a) adquieren un perfil de migración a piel, y/o

b) adquieren un perfil de producción de citoquinas no pro-inflamatorias.

15. El método de tratamiento y/o prevención según la reivindicación 14, caracterizado porque el perfil de migración a piel definido en a) comprende un descenso en la expresión del marcador de migración a mucosa intestinal integrina β7 y un aumento en la expresión del marcador de migración a piel CLA.

16. El método de tratamiento y/o prevención según la reivindicación 14, caracterizado porque el perfil de producción de citoquinas no pro-inflamatorias definido en b) comprende un descenso en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias IFNγ e interleuquina 17.

17. El método de tratamiento y/o prevención según las reivindicaciones 7 - 16, caracterizado porque el péptido ST definido en las reivindicaciones 1 – 6 se encuentra contenido en un alimento funcional o en una composición farmacéutica.

18. Un alimento funcional caracterizado por comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST definido en las reivindicaciones 1 – 6.

19. Una composición farmacéutica caracterizada por comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST definido en las reivindicaciones 1 – 6.

20. Uso del péptido ST definido en las reivindicaciones 1 – 6 en una aplicación cosmética.

FIG. 1

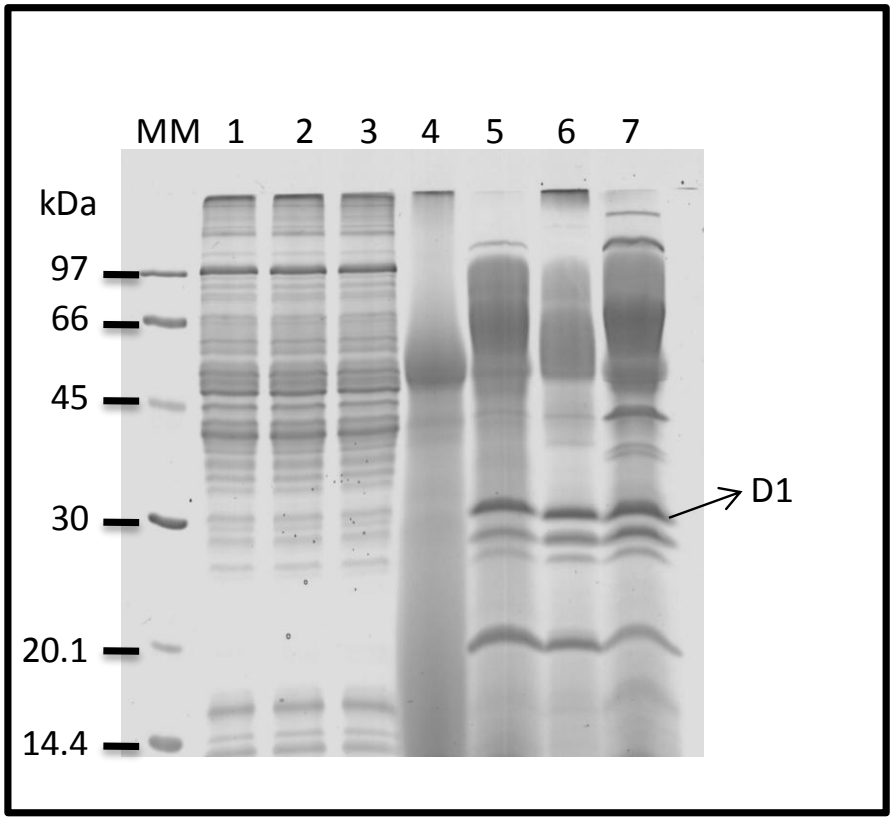
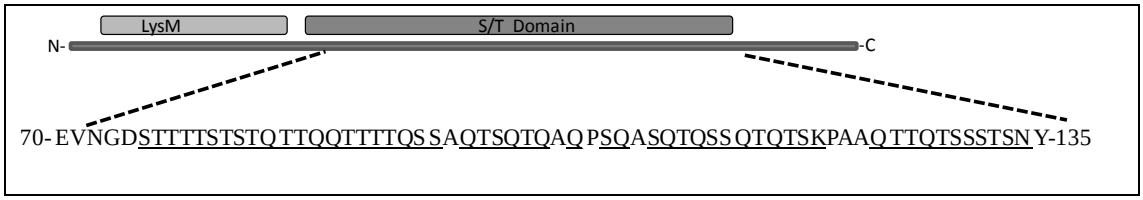


FIG. 2

A.



SEQ ID NO: 2

B.

Péptido ST
GEVDGDSTTTTSTSTQTTQQTTTTQSSAQTSQTQAQPSQASQTQSSQTQTSKPAAQTTQTSSSTSNYHHHHHH

SEQ ID NO: 1

FIG. 3

A.

```
        Ch_lo_Pn1.3_Pn2
             Pn1.3_Pn2|
   Ch_lo_Pn1.3_Pn2   ||
        Pn1.3_Pn2|   ||
Ch_lo_Pn1.3_Pn2||   ||
     Pn1.3_Pn2|||   ||

            ||||   ||
            NLILVGQQLEVNGDSTTTTSTSTQTTQQTTTTQSSAQTSQTQAQPSQASQTQSSQTQTSK
     61     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+   120
```

SEQ ID NO: 3

B.

```
                                                  Ch_hi_Ch_lo_Pn1.3
                                                              Pn1.3|
                                                Ch_lo_Pn1.3_Pn2  ||
                                          Ch_hi_Ch_lo_Pn1.3_Pn2|  ||
                                                        Pn1.3||  ||
                                            Ch_lo_Pn1.3_Pn2  |||  ||
                                        Ch_hi_Ch_lo_Pn1.3 |  |||  ||
                                             Pn1.3_Tryps| |  |||  ||
                                    Ch_hi_Ch_lo_Pn1.3  || |  |||  ||
                                               Pn1.3|  || |  |||  ||
                                              Tryps  ||  || |  |||  ||
                                 Ch_hi_Ch_lo_Pn1.3  |  ||  || |  |||  ||
                                            Pn1.3|  |  ||  || |  |||  ||
                                          Tryps    ||  |  ||  || |  |||  ||
                             Ch_hi_Ch_lo   |    ||  |  ||  || |  |||  ||
          Ch_hi_Ch_lo_Pn1.3      Pn1.3|   |    ||  |  ||  || |  |||  ||
                     Pn1.3|     Tryps||   |    ||  |  ||  || |  |||  ||

                        ||         |||   |    ||  |  ||  || |  |||  ||
            PAAQTTQTSSSTSNYSNNGSDSAAKAWIAGKESGGSYSARNGQYIGKYQLSASYLNGDYS
     121    ---------+---------+---------+---------+---------+---------+   180
```

SEQ ID NO: 4

ABREVIATURAS

* Ch-hi → Corte de la quimotripsina (alta especificidad) (C-terminal de la secuencia [FYW], excepto antes de P)
* Ch-lo → Corte de la quimotripsina (baja especificidad) (C-terminal de la secuencia [FYWML], excepto antes de P)
* Pn1.3 → Pepsina (pH1.3)
* Pn2 → Pepsina (pH>2)
* Tryps → Tripsina

FIG. 4

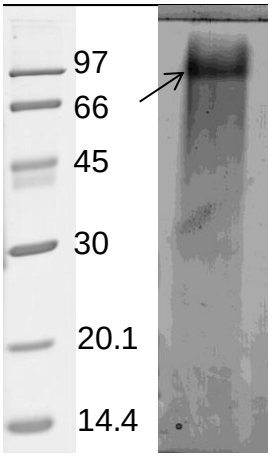

97
66
45
30
20.1
14.4

FIG. 5

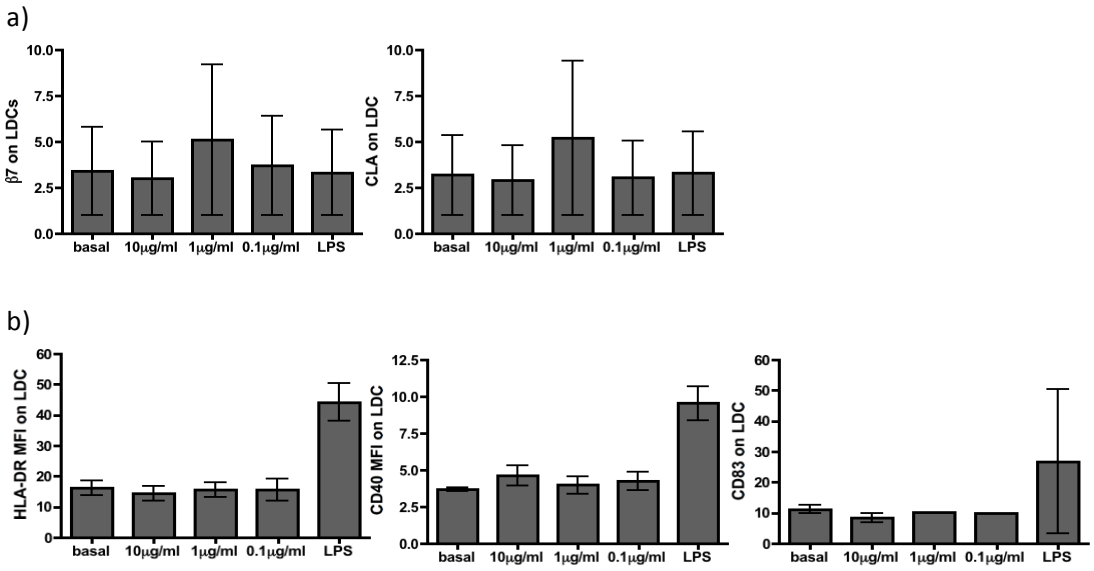

a)
β7 on LDCs
CLA on LDC
b)
HLA-DR MFI on LDC
CD40 MFI on LDC
CD83 on LDC
basal
10μg/ml
1μg/ml
0.1μg/ml
LPS

FIG. 6

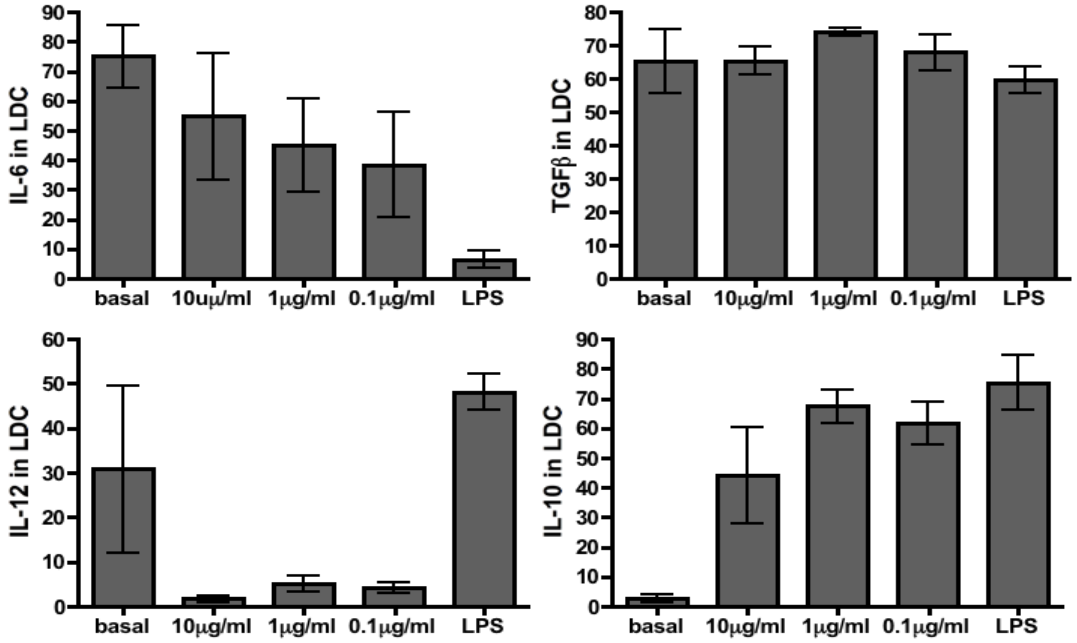

IL-6 in LDC
TGFβ in LDC
IL-12 in LDC
IL-10 in LDC
basal
10uμ/ml
10μg/ml
1μg/ml
0.1μg/ml
LPS

FIG. 7

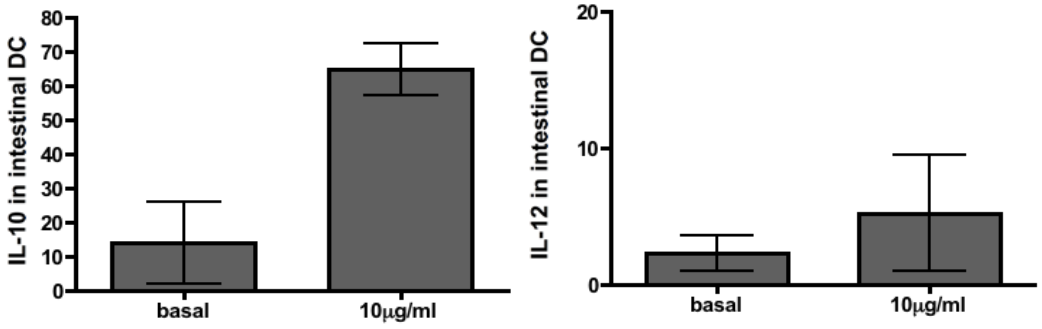

IL-10 in intestinal DC
IL-12 in intestinal DC
basal
10μg/ml

FIG. 8

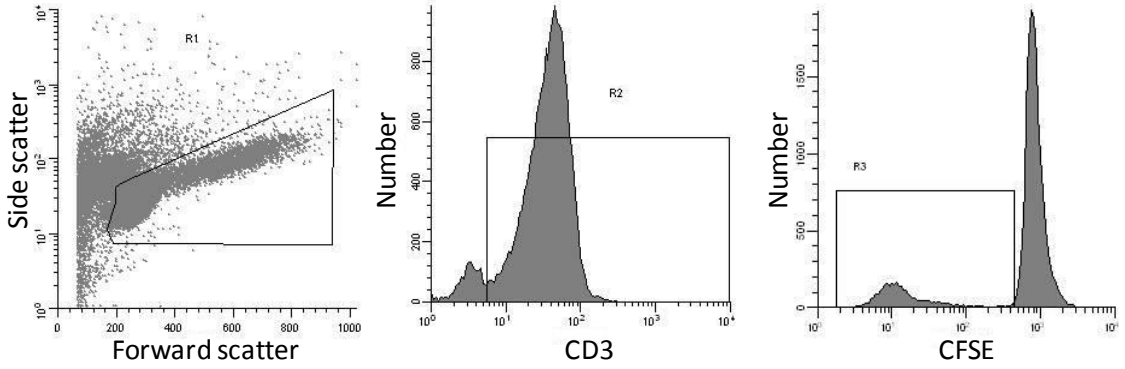

R1
Side scatter
Forward scatter
R2
Number
CD3
R3
Number
CFSE

FIG. 9

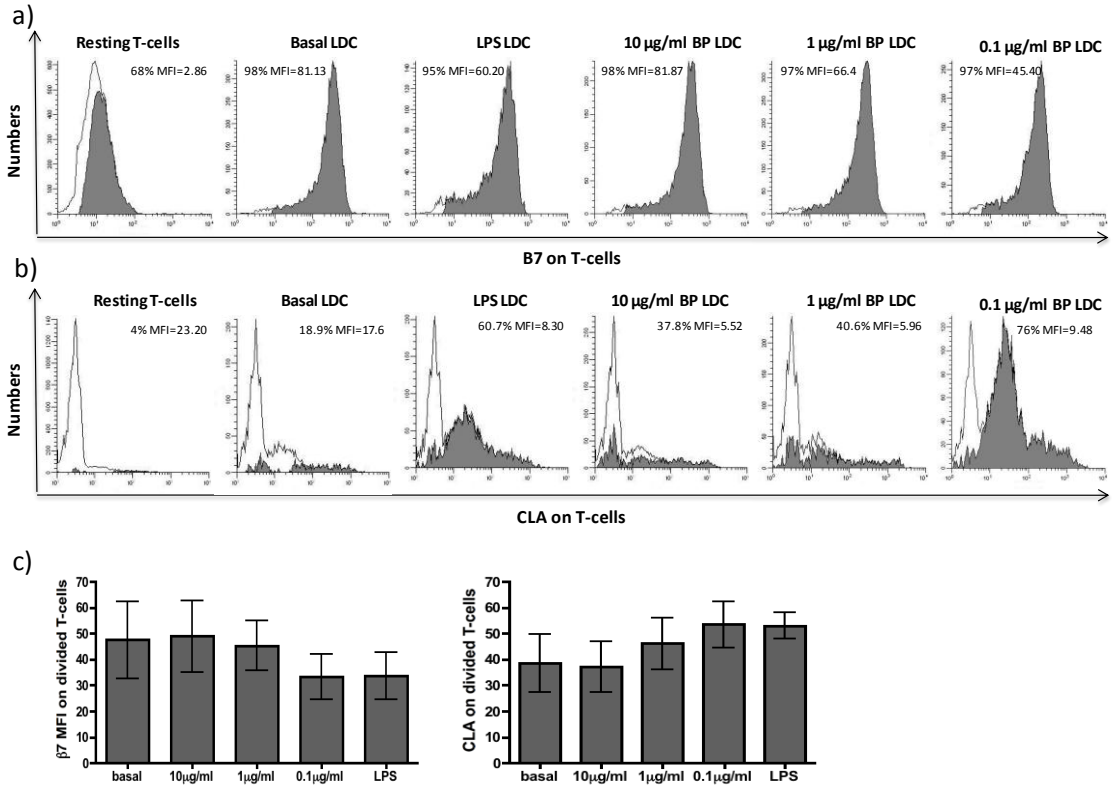

a)
Resting T-cells
68% MFI=2.86
Basal LDC
98% MFI=81.13
LPS LDC
95% MFI=60.20
10 µg/ml BP LDC
98% MFI=81.87
1 µg/ml BP LDC
97% MFI=66.4
0.1 µg/ml BP LDC
97% MFI=45.40
Numbers
B7 on T-cells
b)
Resting T-cells
4% MFI=23.20
Basal LDC
18.9% MFI=17.6
LPS LDC
60.7% MFI=8.30
10 µg/ml BP LDC
37.8% MFI=5.52
1 µg/ml BP LDC
40.6% MFI=5.96
0.1 µg/ml BP LDC
76% MFI=9.48
Numbers
CLA on T-cells
c)
β7 MFI on divided T-cells
basal
10µg/ml
1µg/ml
0.1µg/ml
LPS
CLA on divided T-cells
basal
10µg/ml
1µg/ml
0.1µg/ml
LPS

FIG. 10

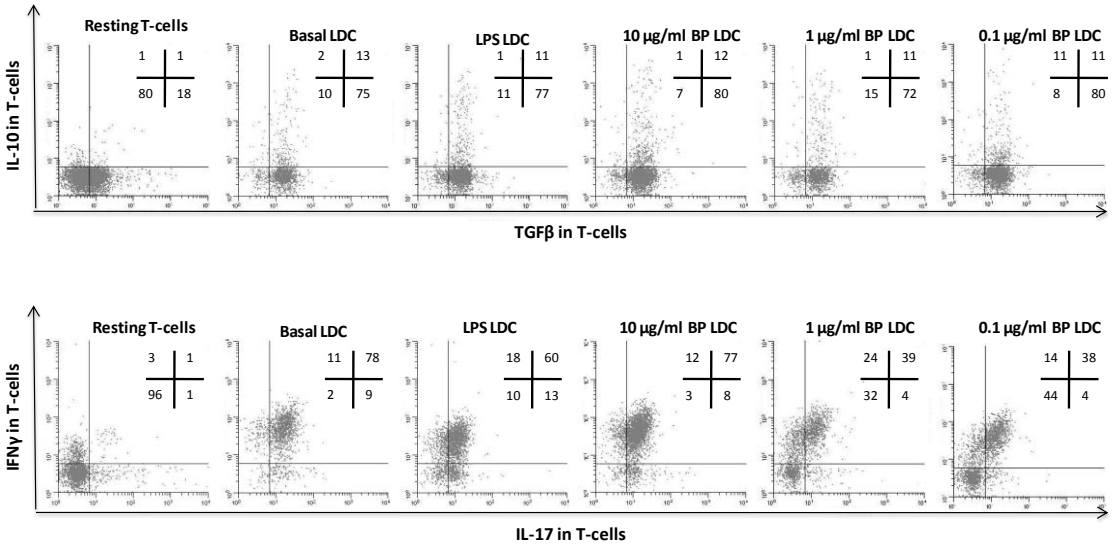
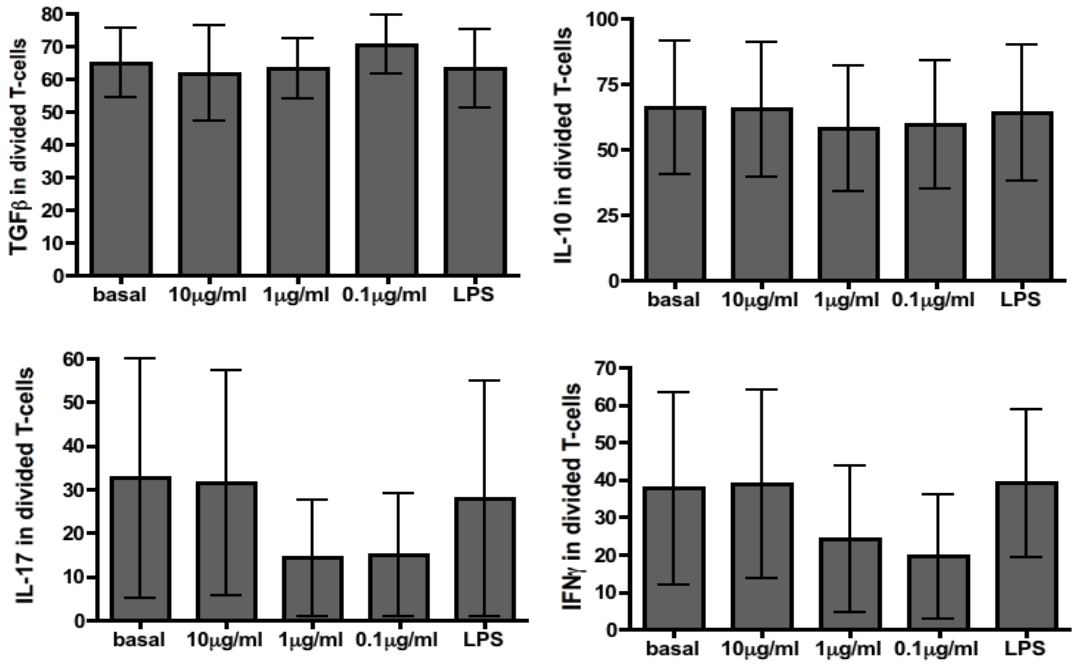

Resting T-cells
1 1
80 18
Basal LDC
2 13
10 75
LPS LDC
1 11
11 77
10 µg/ml BP LDC
1 12
7 80
1 µg/ml BP LDC
1 11
15 72
0.1 µg/ml BP LDC
11 11
8 80
IL-10 in T-cells
TGFβ in T-cells
Resting T-cells
3 1
96 1
Basal LDC
11 78
2 9
LPS LDC
18 60
10 13
10 µg/ml BP LDC
12 77
3 8
1 µg/ml BP LDC
24 39
32 4
0.1 µg/ml BP LDC
14 38
44 4
IFNγ in T-cells
IL-17 in T-cells

FIG. 11


TGFβ in divided T-cells
0
10
20
30
40
50
60
70
80
basal
10µg/ml
1µg/ml
0.1µg/ml
LPS
IL-10 in divided T-cells
0
25
50
75
100
basal
10µg/ml
1µg/ml
0.1µg/ml
LPS
IL-17 in divided T-cells
0
10
20
30
40
50
60
basal
10µg/ml
1µg/ml
0.1µg/ml
LPS
IFNγ in divided T-cells
0
10
20
30
40
50
60
70
basal
10µg/ml
1µg/ml
0.1µg/ml
LPS

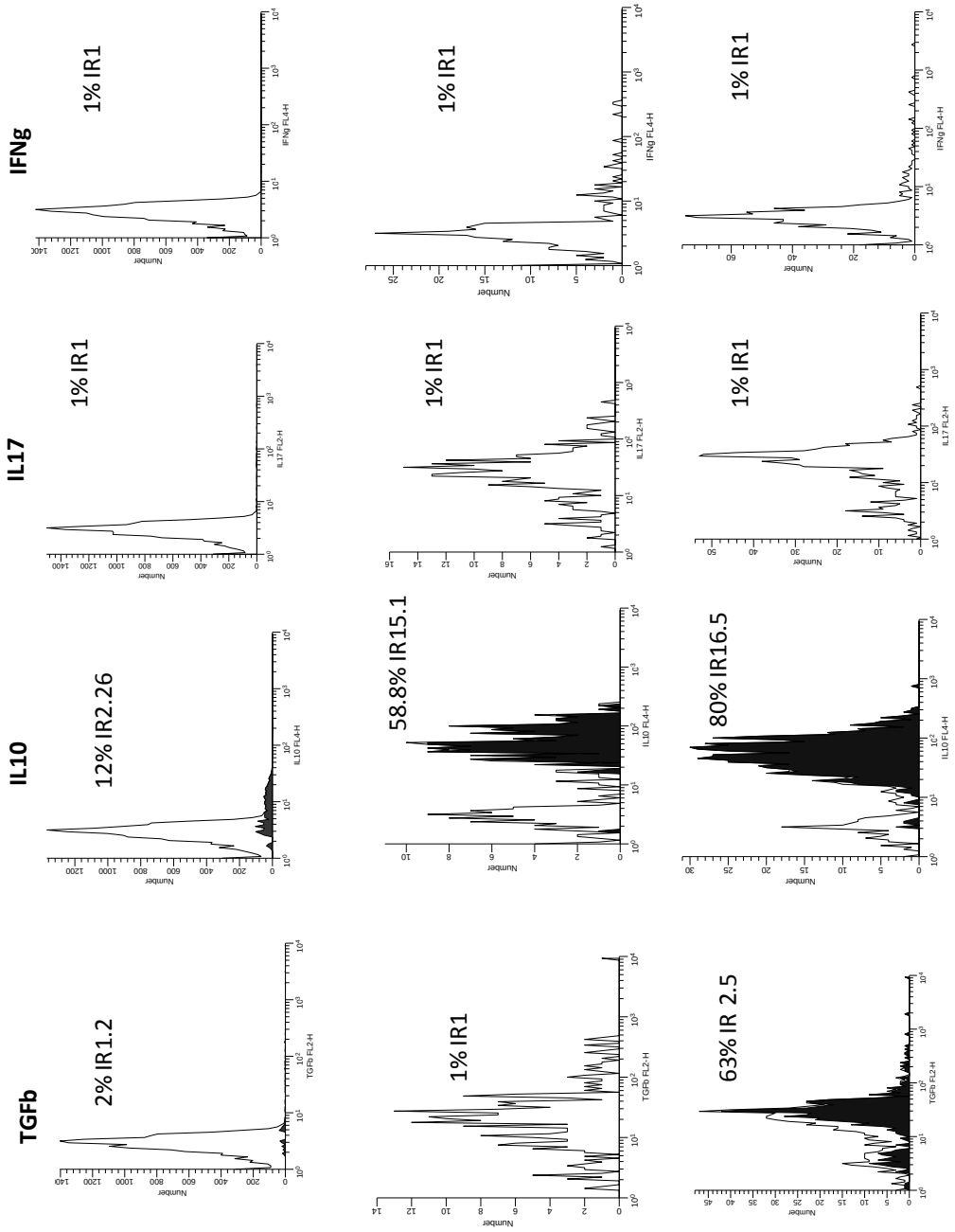

TGFb
IL10
IL17
IFNg
2% IR1.2
12% IR2.26
1% IR1
1% IR1
1% IR1
58.8% IR15.1
1% IR1
1% IR1
1% IR1
63% IR 2.5
80% IR16.5
Resting T-cells
3% Basal gut DC
3% Peptide gut DC

FIG. 12

FIG. 13

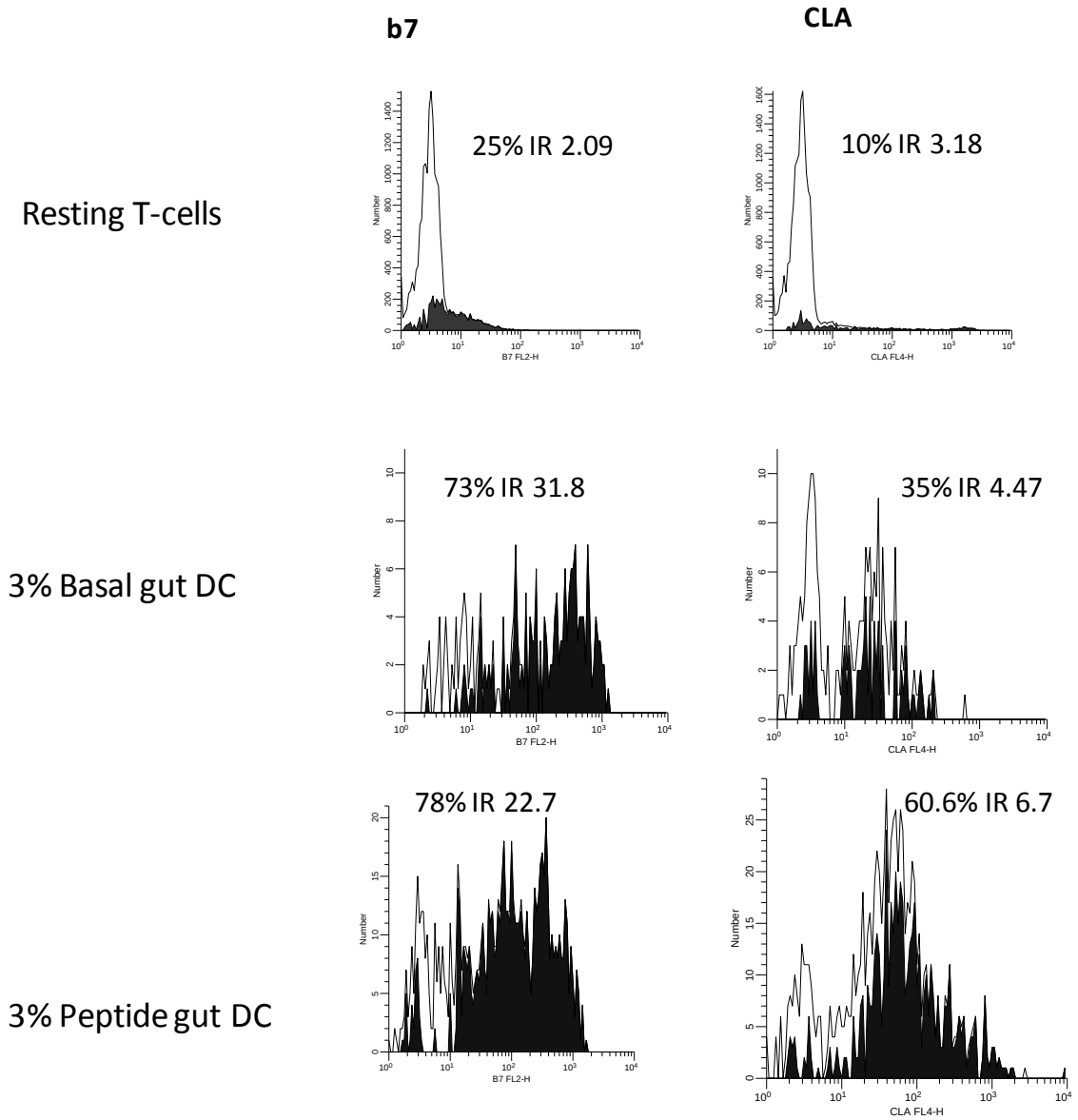
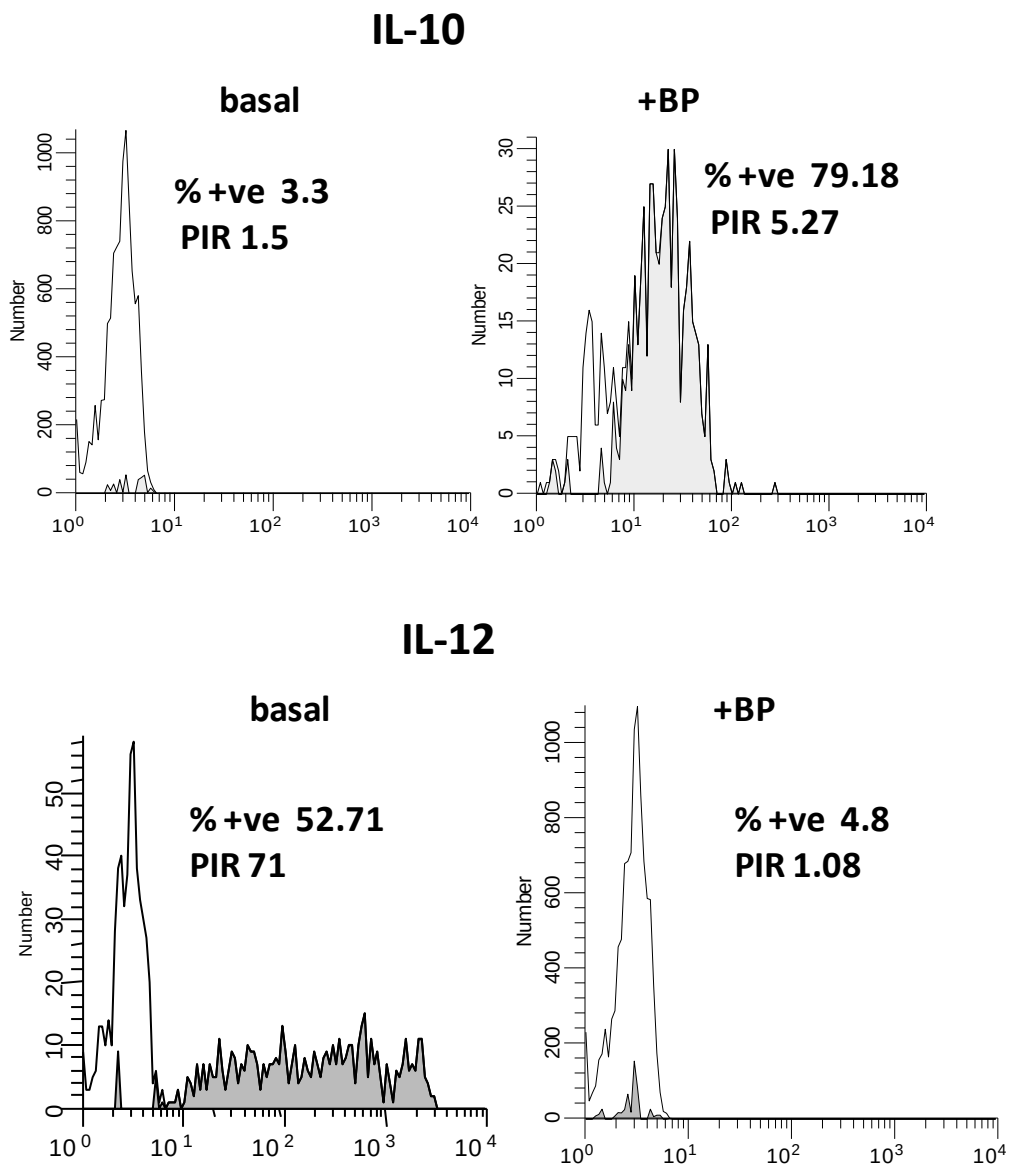

b7
CLA
Resting T-cells
25% IR 2.09
10% IR 3.18
3% Basal gut DC
73% IR 31.8
35% IR 4.47
3% Peptide gut DC
78% IR 22.7
60.6% IR 6.7
Number
B7 FL2-H
CLA FL4-H

FIG. 14


IL-10
basal
+BP
% +ve 3.3
PIR 1.5
% +ve 79.18
PIR 5.27
Number
IL-12
basal
+BP
% +ve 52.71
PIR 71
% +ve 4.8
PIR 1.08
Number

Lista de Secuencias

```
<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
      IMPERIAL COLLEGE LONDON

<120> PEPTIDO SECRETADO POR LACTOBACILLUS PLANTARUM CON FUNCION INMUNOMODULADORA

<130> 5110221 BORJA SANCHEZ

<160> 4

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1
<211> 73
<212> PRT
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..73
<223> /mol_type="protein"
      /note="Secuencia del peptido ST"
      /organism="Lactobacillus plantarum"

<400> 1
Gly Glu Val Asp Gly Asp Ser Thr Thr Thr Thr Ser Thr Ser Thr Gln
1               5                   10                  15
Thr Thr Gln Gln Thr Thr Thr Thr Gln Ser Ser Ala Gln Thr Ser Gln
            20                  25                  30
Thr Gln Ala Gln Pro Ser Gln Ala Ser Gln Thr Gln Ser Ser Gln Thr
        35                  40                  45
Gln Thr Ser Lys Pro Ala Ala Gln Thr Thr Gln Thr Ser Ser Ser Thr
    50                  55                  60
Ser Asn Tyr His His His His His His
65                  70

<210> 2
<211> 66
<212> PRT
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..66
<223> /mol_type="protein"
      /note="Aminoacidos 70-135 de la proteina D1"
      /organism="Lactobacillus plantarum"

<400> 2
Glu Val Asn Gly Asp Ser Thr Thr Thr Thr Ser Thr Ser Thr Gln Thr
1               5                   10                  15
Thr Gln Gln Thr Thr Thr Thr Gln Ser Ser Ala Gln Thr Ser Gln Thr
            20                  25                  30
Gln Ala Gln Pro Ser Gln Ala Ser Gln Thr Gln Ser Ser Gln Thr Gln
        35                  40                  45
Thr Ser Lys Pro Ala Ala Gln Thr Thr Gln Thr Ser Ser Ser Thr Ser
    50                  55                  60
Asn Tyr
65

<210> 3
<211> 60
<212> PRT
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..60
<223> /mol_type="protein"
```

/note="Aminoacidos 61-120 de la proteina D1"
/organism="Lactobacillus plantarum"

<400> 3
Asn Leu Ile Leu Val Gly Gln Gln Leu Glu Val Asn Gly Asp Ser Thr
1 5 10 15
Thr Thr Thr Ser Thr Ser Thr Gln Thr Thr Gln Gln Thr Thr Thr Thr
20 25 30
Gln Ser Ser Ala Gln Thr Ser Gln Thr Gln Ala Gln Pro Ser Gln Ala
35 40 45
Ser Gln Thr Gln Ser Ser Gln Thr Gln Thr Ser Lys
50 55 60

<210> 4
<211> 60
<212> PRT
<213> Lactobacillus plantarum

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..60
<223> /mol_type="protein"
/note="Aminoacidos 121-180 de la proteina D1"
/organism="Lactobacillus plantarum"

<400> 4
Pro Ala Ala Gln Thr Thr Gln Thr Ser Ser Ser Thr Ser Asn Tyr Ser
1 5 10 15
Asn Asn Gly Ser Asp Ser Ala Ala Lys Ala Trp Ile Ala Gly Lys Glu
20 25 30
Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Ala Arg Asn Gly Gln Tyr Ile Gly Lys Tyr
35 40 45
Gln Leu Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Gly Asp Tyr Ser
50 55 60

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201131469

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 07.09.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	**(56) Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	WO 2011052996 A2 (CJ CHEILJEDANG CORP. [KR/KR]) 05.05.2011, párrafos 10 -20; párrafos 27 -35; reivindicaciones 1-10.	1-14
A	WO 2009138092 A1 (OÜ TERVISLIKU PIIMA BIOTEHNOLOOGIATE ARENDUSKESKUS [EE/EE]) 19.11.2009, página 8, línea 30 – página 9, línea 18; página 20, línea 15 – página 22, línea 4; reivindicaciones 1-8.	1-14
A	FR 2848115 A1 (RHODIA CHIMIE) 11.06.2004, página 2, líneas 1 – 21; página 3, línea 23 – página 4, línea 8; reivindicaciones 1, 4, 16, 19-21.	1-14
A	WO 2006110088 A1 (BIOGAIA AB [SE/SE]) 19.10.2006, página 6, líneas 14-23; reivindicaciones 1-7.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
29.11.2012	M. D. García Grávalos	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/335 (2006.01)
A61K38/16 (2006.01)
A23L1/30 (2006.01)
A61P37/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A23L, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.11.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-14	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-14	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2011052996 A2	05.05.2011
D02	WO 2009138092 A1	19.11.2009
D03	FR 2848115 A1	11.06.2004
D04	WO 2006110088 A1	19.10.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga un péptido, con actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria, segregado por una cepa de *Lactobacillus plantarum*, cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO: 1 (reivindicaciones 1-5); así como su uso para preparar un medicamento o composición farmacéutica, para prevención y/o tratamiento de una enfermedad intestinal, un alimento funcional o un cosmético (reivindicaciones 6-14).

El documento D01 divulga una cepa de *Lactobacillus plantarum*, definida como *L. plantarum* CJLP243, con número de depósito KCCM11045P y su uso para preparar una composición farmacéutica, para prevención y/o tratamiento de una enfermedad intestinal o inmunológica, o una composición nutricional o cosmética (ver párrafos 10 -20; párrafos 27 -35; reivindicaciones 1-10).

El documento D02 divulga una cepa de *Lactobacillus plantarum*, definida como *L. plantarum* Inducia DSM 21379, productora de poliaminas, con actividad antioxidante, inmunomoduladora y antiinflamatoria; así como su uso para elaborar una composición farmacéutica o nutricional (ver página 8, línea 30 - página 9, línea 18; página 20, línea 15 - página 22, línea 4; reivindicaciones 1-8).

El documento D03 divulga una composición farmacéutica o nutricional, que comprende al menos una cepa bacteriana, que puede ser una cepa de *Lactobacillus plantarum* PTA-4799, para prevención y/o tratamiento de una enfermedad intestinal (ver página 2, líneas 1 - 21; página 3, línea 23 - página 4, línea 8; reivindicaciones 1, 4, 16, 19-21).

El documento D04 divulga una selección de cepas de *Lactobacillus* para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para tratamiento de una enfermedad intestinal (ver página 6, líneas 14-23; reivindicaciones 1-7).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

La presente invención divulga un péptido segregado por una cepa de *Lactobacillus plantarum*, cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO: 1 y su uso para preparar un medicamento o composición farmacéutica, para prevención y/o tratamiento de una enfermedad intestinal, un alimento funcional o un cosmético.

1.1. REIVINDICACIONES 1-14

Los documentos D01 y D02 se consideran los más cercanos al estado de la técnica, ya que anticipan el uso de cepas de *Lactobacillus plantarum* en la elaboración de composiciones farmacéuticas para prevención y/o tratamiento de una enfermedad intestinal y en la preparación de composiciones nutricionales o cosméticas.

La diferencia entre los documentos citados y la presente invención radica en el uso de un péptido, segregado por *Lactobacillus plantarum*, en lugar del microorganismo para preparar las composiciones indicadas.

El péptido, cuya secuencia de aminoácidos presenta al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO: 1, no ha sido encontrado en el estado de la técnica, ni tampoco el uso de un péptido segregado por *Lactobacillus* para elaboración de composiciones farmacéuticas, nutricionales o cosméticas, por lo que se considera que la invención proporciona un péptido nuevo y unas composiciones nuevas, alternativas a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-14 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D03 - D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.