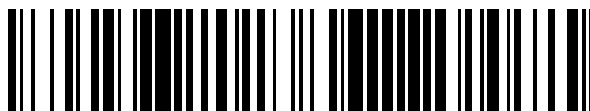


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 667**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2011 E 11176165 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 2436693**

54 Título: **Genes sintéticos que codifican fragmentos de péptido de proteínas naturales de mielina para la inducción de la tolerancia oral, fragmento de ADN que comprende estos genes, medios para obtener estos péptidos en un sistema microbiano (bacteriano) y su aplicación médica**

30 Prioridad:

02.08.2010 PL 39203710

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

29.02.2016

73 Titular/es:

**INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI PAN (100.0%)
Ul. Pawinskiego 5A
02-106 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**SZCZEPANKOWSKA, M. AGNIESZKA;
BARDOWSKI, JACEK;
ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, TAMARA;
KASARELLO, KAJA;
LIPKOWSKI, ANDRZEJ W. y
KWIATKOWSKA- PATZER, BARBARA**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 561 667 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes sintéticos que codifican fragmentos de péptido de proteínas naturales de mielina para la inducción de la tolerancia oral, fragmento de ADN que comprende estos genes, medios para obtener estos péptidos en un sistema microbiano (bacteriano) y su aplicación médica

Campo técnico

[0001] El tema de la invención es un gen sintético que codifica proteína de mielina de bajo peso molecular, procedente de fragmentos de proteína de médula espinal, para su uso en la inducción específica de tolerancia oral.

Estado de la técnica anterior

[0002] La esclerosis múltiple es una enfermedad destructiva del sistema nervioso central que afecta principalmente a personas jóvenes, entre 20 y 40 años de edad. Los datos de incidencia indican que alrededor de 60.000 personas padecen esta enfermedad en Polonia. Es una enfermedad autoinmunitaria, para la cual, hasta ahora, no hay tratamiento eficaz. Los fármacos inmunomoduladores, tales como interferón y Copaxone, solo modifican la evolución de la enfermedad, reduciendo el número de crisis, pero después de 6 años de tratamiento, la discapacidad de las personas con esclerosis múltiple es la misma que sin tratamiento. Además, el tratamiento de esta enfermedad es bastante caro, y el reembolso de los gastos médicos - infrecuente. De ahí la necesidad de investigación exhaustiva sobre nuevos métodos eficaces y económicamente rentables para el tratamiento de esta enfermedad inmunitaria crónica.

[0003] Las enfermedades autoinmunitarias se basan en un reconocimiento patológico por el sistema inmunitario de las propias proteínas del organismo como antígenos extraños, lo cual, en consecuencia, conduce a la inducción de mecanismos que eliminan estos antígenos. En la esclerosis múltiple, los fragmentos de proteínas de mielina del sistema nervioso central constituyen antígenos que los anticuerpos reconocen de forma patológica.

[0004] Se ha dado a conocer el mecanismo de tolerancia alimentaria, en el cual, se desensibiliza de forma específica al sistema inmunitario con respecto a nutrientes alimentarios. Se ha propuesto usar este mecanismo para la inducción de tolerancia a epítopos de proteínas en enfermedades autoinmunitarias, tales como reuma y esclerosis múltiple. Los propios estudios de los autores demuestran que los hidrolizados de la médula espinal de animales de granja, que contienen fragmentos de péptidos de mielina de bajo peso molecular, presentan una actividad que modula la evolución de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en un modelo animal de esclerosis múltiple (EM) (1).

[0005] El emprendimiento de estudios dirigidos al desarrollo de un método de producción de péptidos de mielina en bacterias acidolácticas se asoció con una serie de premisas: (i) la importante situación de la esclerosis múltiple entre las enfermedades que aparecen en Polonia; (ii) baja eficacia y elevados costes del tratamiento médico de esta enfermedad; (iii) eficacia demostrada de los péptidos en la terapia de esta unidad de enfermedad; (iv) el papel documentado del intestino (tracto digestivo) en el sistema inmunitario del organismo; (v) resultados positivos previos del uso de bacterias acidolácticas como productoras de factores inmunomoduladores (citocinas y antígenos), incluyendo vacunas orales; (vi) datos que indican que las bacterias intensifican el efecto de la tolerancia oral (2).

Estado de conocimiento actual

[0006] Las dianas reconocidas en el ataque sobre el sistema inmunitario en la esclerosis múltiple y en el modelo animal de encefalitis alérgica experimental (EAE) son las proteínas de mielina. Los principales componentes proteicos de la mielina son tres proteínas:

(i) proteína básica de mielina (MBP, de *myelin basic protein*), cuya secuencia de aminoácidos humana se representa mediante la fórmula **13** (3)

(ii) proteína proteolipídica (PLP, de *proteolipid protein*) cuya secuencia de aminoácidos humana se representa mediante la fórmula **14** (4)

(iii) glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (MOG, de *myelin-oligodendrocyte glycoprotein*) cuya secuencia de aminoácidos humana se representa mediante la fórmula **15** (5).

[0007] Estudios realizados durante la última década ofrecen datos de que los fragmentos de péptidos, que son productos de la hidrólisis parcial de proteínas alimenticias, también tienen la capacidad de atravesar la barrera intestinal. Algunos péptidos cortos atraviesan esta barrera más fácilmente que los aminoácidos individuales. Para diferenciar los péptidos alimentarios que atraviesan la barrera hematointestinal de proteínas bacterianas y víricas invasoras, los organismos han desarrollado un sistema específico de presentación de antígenos alimentarios, como resultado del cual se reduce la inmunogenicidad específica para ciertas secuencias de péptidos (y también para

otros componentes de nutrientes no peptídicos). Este fenómeno se ha denominado tolerancia oral.

[0008] La presente invención se basa en nuestra propia investigación preliminar. La aplicación de una preparación de hidrolizado de médula espinal en una dosis seleccionada de forma arbitraria en ratas con EAE condujo a la reducción de los síntomas inflamatorios cuando se aplicaron tanto antes como después de la inducción de la EAE (6).

[0009] La explotación de bacterias acidolácticas como fábricas biológicas productoras de fragmentos de péptido de proteínas naturales de mielina es de gran interés científico y práctico y presenta muchos aspectos médicos y farmacológicos beneficiosos.

[0010] Las bacterias acidolácticas (BAL) constituyen un grupo grande y taxonómicamente variado de bacterias grampositivas. Una ventaja indiscutible de estas bacterias es su estado GRCS (Generalmente Reconocido Como Seguro), es decir, bacterias no patógenas y seguras para los seres humanos y los animales. Las bacterias acidolácticas son un objeto significativo de usos biotecnológicos, así como básicas en la investigación aplicada. El uso biotecnológico de bacterias acidolácticas encuentra aplicación en diversas ramas de la industria (7) -alimentaria (p. ej., producción de productos de leche fermentada, comidas y alimentos, así como aditivos de alimentos), química (p. ej., producción de polímeros y enzimas) y farmacéutica (p. ej., preparación de probióticos, tales como Lactid o Lactovaginal). En los últimos años se han puesto grandes esperanzas en el uso de estas bacterias en la producción de alimentos funcionales, probióticos, así como fármacos en forma de vacunas orales (7, 8, 9). Con respecto a las últimas, las altas expectativas se asocian con la explotación de bacterias acidolácticas como vectores vacunales (10-12). Asimismo, desde hace unos pocos años se ha observado un aumento en la investigación dirigida hacia la aplicación de bacterias acidolácticas a la producción de diferentes proteínas de significación terapéutica o profiláctica. Se han intentado usar bacterias acidolácticas en la profilaxis y el tratamiento de un síndrome conocido como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la cual incluye también la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

[0011] El objetivo de los presentes inventores fue el desarrollo de un sistema biológico, basado en bacterias acidolácticas, para la producción de fragmento de péptido de proteínas naturales de mielina, para crear una preparación para la inducción de tolerancia oral.

[0012] El fragmento de péptido de proteína natural de mielina para su uso en la invención se seleccionó sobre la base de estudios propios, que indicaron que los pacientes con esclerosis múltiples se identifican con el antígeno HLA-DR2 que reconoce el fragmento 84-103 de la proteína MBP (13). También se identifican anticuerpos contra otros fragmentos de las tres proteínas principales (14, 15) y durante la progresión de la enfermedad aumenta el número de antígenos reconocidos procedentes de las tres proteínas básicas de mielina. Las observaciones anteriores están conectadas muy probablemente con la disponibilidad de estas proteínas, así como de sus fragmentos, en los pacientes. La inmunogenicidad de los fragmentos de proteínas naturales de mielina seleccionados también se confirmó en modelos animales de EAE (16, 17, 18).

[0013] Inesperadamente, durante la ejecución de la invención se puso de manifiesto que es posible:

1. generar, mediante el método de PCR, genes sintéticos que codifiquen el fragmento seleccionado de péptido de proteína natural de mielina.
2. clonar, en células de las cepas seleccionadas de bacterias acidolácticas grampositivas del género *Lactococcus*, los genes recombinantes obtenidos en vectores de clonación adecuados;
3. expresar en bacterias acidolácticas seleccionadas (*Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) genes que codifiquen fragmentos de péptido de proteínas naturales de mielina;
4. clonar genes que codifiquen fragmentos de péptido de proteínas naturales de mielina en células de bacterias gramnegativas (*Escherichia coli*);

optimizar la biosíntesis de péptidos de mielina en bacterias acidolácticas.

Resumen de la invención

[0014] Gen sintético para su uso en la inducción de tolerancia oral, en el que el gen contiene el fragmento de nucleótidos MBP21-40 ATGGATCATGCTCGTCATGGTTTTTTACCACGTCATCGTGATACTGGTATTTTATAG ATTCA (fórmula 1), que codifica un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos MDHARHGFLPRHRDTGILDS (fórmula 1a), siendo dicho péptido un fragmento de una proteína natural de mielina.

[0015] El método para generar el gen que codifica un fragmento de péptido de proteína natural de mielina, de acuerdo con la invención, se basa en la síntesis mediante el método de PCR de un gen sintético que codifica un fragmento de péptido de proteínas naturales de mielina usando 2 cebadores complementarios ("LONG") presentados en la tabla 1, específicos para el péptido particular, cuya secuencia de nucleótidos se diseñó de modo que correspondiesen a los codones que aparecen preferentemente en bacterias de *Lactococcus lactis*. Además, se divulgan las secuencias de nucleótidos de los cebadores "FLONG" (de *forward* LONG, LONG directos) para los

- péptidos MBP85-97, PLP139-151 y PLP178-191, que se modificaron mediante la introducción de una secuencia correspondiente al codón de inicio de la traducción (ATG), justo antes de la secuencia que codifica el primer aminoácido de la secuencia original de péptido. Al mismo tiempo, los extremos 5' de los cebadores del "FLONG_péptido" contienen una secuencia adicional de RBS (sitio de unión al ribosoma, *ribosome binding site*), típica de las bacterias de *Lactococcus lactis*, reconocida mediante la maquinaria de la traducción, y una secuencia "espaciadora" (secuencia de ligamiento) localizada entre la región RBS y el codón de inicio de la traducción. Los cebadores "LONG" se usan como moldes para sintetizar mediante la técnica de PCR los genes sintéticos, usando cebadores cortos ("SHORT") homólogos a los extremos 5' de los cebadores "FLONG_péptido" y "RLONG_péptido", en los que los extremos 5' de los cebadores "SHORT" portan secuencias adicionales reconocidas mediante enzimas de restricción específicas, preferentemente Sall (para el cebador SHORT directo) y PstI (para el cebador SHORT inverso), mientras que los extremos 5' de los cebadores del "revSHORT_péptido" (de *reverse SHORT*, SHORT inversos) tienen una secuencia adicional repetida dos veces que corresponde al codón de terminación de la traducción (TAA) (tabla 2).
- 15 **[0016]** También se divulgan fragmentos de ADN obtenidos mediante la reacción de PCR mencionada anteriormente usando los cebadores "LONG" y "SHORT", cuyas secuencias de nucleótidos comprenden la secuencia de genes sintéticos de los péptidos seleccionados de proteínas naturales de mielina (secuencias subrayadas), de acuerdo con la invención, representadas mediante la fórmula 6, la fórmula 7, la fórmula 8, la fórmula 9 y la fórmula 10.
- 20 **[0017]** El método de clonación del fragmento de ADN generado que comprende el gen sintético, de acuerdo con la invención, se basa en someterlo a la digestión por enzimas de restricción, favorablemente PstI y Sall, y, después, ligarlo con un vector de plásmido que se replica en células de bacterias acidolácticas, favorablemente en *Lactococcus*, en particular, con el vector pIL253, digerido de antemano con las mismas enzimas de restricción, para obtener plásmidos recombinantes, en los que la orientación de los productos clonados de PCR (insertos) está de acuerdo con la dirección de la transcripción dirigida desde el promotor interno presente en el vector, a fin de introducir el ADN recombinante mediante el método de electroporación dentro de células de cepas bacterianas, que se cultivan de una forma conocida. Las células que contienen el nuevo gen se aíslan a partir de la población del cultivo, favorablemente mediante el análisis de la presencia de insertos cuya longitud corresponda a la longitud de los fragmentos de ADN que comprenden los genes sintéticos esperados, en los transformantes obtenidos mediante la técnica de PCR. La coincidencia de las secuencias de nucleótidos de los genes clonados con la secuencia de nucleótidos del gen sintético se examina mediante la técnica de secuenciación de ADN.
- 30 **[0018]** En el método de clonación, es favorable usar como cepas bacterianas acidolácticas grampositivas en las que se introduce el ADN recombinante cepas de *Lactococcus*, p. ej., *Lactococcus lactis* IL1403, *Lactococcus lactis* IBB477 y *Lactococcus lactis* IBB360, cuya viabilidad en el intestino de mamífero difiere, así como otros géneros de bacterias acidolácticas, preferentemente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.
- 35 **[0019]** El método de producción de los péptidos seleccionados en un sistema bacteriano se basa en la expresión de genes sintéticos de los péptidos seleccionados en células de cepas de bacterias acidolácticas, en particular, *Lactococcus*, mediante su cultivo en un medio conocido específico para bacterias acidolácticas, preferentemente en medio M17 o en medio definido MQD (*medio químicamente definido*) complementado con azúcar, favorablemente glucosa o celobiosa, a una concentración no inferior al 0,5 %, o en leche, suero lácteo u otro medio adecuado, a una temperatura que oscila entre 20 °C- 30°C, preferentemente a 30 °C.
- 40 **[0020]** El método de clonación de los genes sintéticos de los péptidos de mielina seleccionados en bacterias gramnegativas, favorablemente, la especie *Escherichia coli*, se basa en el ligamiento del gen sintético amplificado usando cebadores "SHORT" específicos (tabla 2) con el vector, preferentemente con un plásmido pGEMT-Easy disponible en el mercado, u otro vector que se replique en células bacterianas gramnegativas, favorablemente, de la especie *Escherichia coli*, para obtener plásmidos recombinantes. El ADN recombinante se introduce mediante un método conocido, p. ej., electroporación, en células de cepas bacterianas, que se cultivan después de una forma conocida. Las células que contienen el nuevo gen se aíslan a partir de la población cultivada, favorablemente mediante el análisis de la presencia de insertos cuya longitud corresponda a la longitud de los fragmentos de ADN que comprenden los genes esperados, en los transformantes obtenidos mediante la técnica de PCR. La coincidencia de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN clonados con las secuencias de nucleótidos de los genes sintéticos se examina mediante la técnica de secuenciación de ADN.
- 50 **[0021]** En el método de clonación es favorable usar como cepas bacterianas gramnegativas en las que se introduce el ADN recombinante, bacterias de la especie *Escherichia coli*, favorablemente la cepa TG1.
- 55 **[0022]** El método de optimización de la expresión de los genes sintéticos de los fragmentos de péptido de proteína natural de mielina seleccionados, se basa favorablemente en la sustitución del promotor constitutivo interno del vector de plásmido, que se replica en células de *L. lactis*, por un promotor regulado, favorablemente por la región promotora de un gen procedente del genoma de las bacterias de *L. lactis* u otras especies, o del genoma de un bacteriófago, preferentemente por la región promotora del gen *ptcB*, involucrado en el catabolismo del azúcar en las bacterias acidolácticas del género *Lactococcus*, el cual se regula mediante la presencia en el medio de diversos

azúcares, tales como: celobiosa, galactosa, salicina, esculina, glucosa.

5 **[0023]** El método de optimización de la producción de péptidos en un sistema bacteriano, se basa favorablemente en el cultivo de células que portan el vector de plásmido recombinante (con el gen sintético clonado y una región promotora adecuada, favorablemente, el promotor del gen *ptcB* del genoma de bacterias de *Lactococcus*) en un medio conocido específico para bacterias acidolácticas, preferentemente en medio definido MQD (*medio químicamente definido*), complementado con azúcar, favorablemente glucosa o celobiosa, a una concentración de $\geq 0,5 \%$, o en leche, suero lácteo u otro medio adecuado, a una temperatura que oscila entre 20 °C- 30°C, preferentemente a 30 °C.

10 **[0024]** La secuencia de nucleótidos de la región promotora del gen *ptcB*, que comprende la región -10 y -35, representada por la fórmula 11, también se divulga para optimizar la producción del gen sintético que codifica el fragmento de péptido de proteína natural de mielina, de acuerdo con la invención.

15 **[0025]** El método de producción de la secuencia de nucleótido de la región promotora del gen *L. lactisptcB*, así como el método de sustitución del promotor constitutivo interno de un vector de plásmido que se replica en *L. lactis* por la región promotora del gen *L. lactisptcB* de *L. lactis*, se basa en la amplificación mediante la reacción de PCR de la región promotora del gen *ptcB* usando ADN cromosómico de la cepa IL 1403 de *L. lactis* como molde y el par de cebadores (*ptcBfor* y *ptcBrev*), cuyas secuencias son complementarias a las secuencias de ADN adyacentes a la
20 región del promotor del gen *ptcB* cromosómico y están modificados de modo que sus extremos 5' contienen secuencias reconocidas por endonucleasas de restricción específicas, preferentemente *Vspl* (para el cebador *ptcBfor*) y *Ncil* (para el cebador *ptcBrev*) (tabla 3). Como resultado de la reacción de PCR, usando dichos cebadores diseñados, se obtiene un fragmento de ADN cuya secuencia de nucleótidos se representa mediante la fórmula 12, que comprende la secuencia de la región promotora del gen *ptcB* (subrayada).

25 **[0026]** el producto obtenido de esta manera se somete a digestión mediante enzimas de restricción, preferentemente *Vspl* y *Ncil*, y después se liga con los vectores recombinantes que portan el gen sintético que codifica el fragmento de péptido de proteína natural de mielina seleccionado, del que se eliminó la región promotora original (p. ej., mediante digestión usando las mismas restrictasas). El ADN recombinante se introduce mediante el método de
30 electroporación dentro de células de cepas bacterianas que después se cultivan mediante métodos conocidos. Las células que contienen la nueva región promotora se aíslan a partir de la población cultivada, favorablemente mediante el análisis de la presencia de fragmentos de ADN cuya longitud esperada corresponda a la longitud de la región promotora del gen *ptcB* seleccionada, en los transformantes obtenidos mediante la técnica de PCR. La coincidencia de las secuencias de nucleótidos del fragmento de ADN clonado con la secuencia de nucleótidos de la
35 región promotora del gen *ptcB* se examina mediante la técnica de secuenciación de ADN.

[0027] También se divulga la aplicación de bacterias productoras de un fragmento de péptido de proteína natural de mielina de acuerdo con la invención, para la inducción de tolerancia oral.

40 **[0028]** Aplicación de la secuencia de nucleótidos de la región promotora del gen *ptcB*, que comprende la región -10 y -35, representada mediante la fórmula 11, para optimizar la producción un de gen sintético que codifica un fragmento de péptido de proteína natural de mielina de acuerdo con la invención, para la inducción de tolerancia oral.

45 **[0029]** Se espera que las bacterias productoras del fragmento de péptido de proteína natural de mielina, de acuerdo con la invención, inducirán tolerancia oral, como se describe en la bibliografía que se refiere a la administración oral de mezcla de péptido en la forma del hidrolizado de médula espinal de animal, publicada como resultado de estudios propios (1, 6).

50 Descripción de las realizaciones

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y plásmidos usados

55 **[0030]** Las cepas bacterianas y los plásmidos usados en los estudios actuales se presentan en la tabla 4. Las cepas de *Lactococcus lactis* se cultivaron en medio M17 (Oxoid, Anglia) complementado con glucosa al 0,5 %, o en medio definido MQD (*medio químicamente definido*) complementado con glucosa o celobiosa (0,5 %-1 %) a una temperatura entre 20 °C-30 °C. Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron en medio de Luria-Bertani (LB), a una temperatura de 37 °C. Cuando fue necesario, a efectos de selección, se usaron los siguientes antibióticos: 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$
60 de eritromicina para *L. lactis* y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina para *E. coli*.

A continuación se presentan ejemplos de la ejecución de la invención.

Ejemplo

Ejemplo I.

5 **[0031]** Los genes sintéticos se sintetizaron mediante el método de PCR usando para cada péptido dos cebadores complementarios (for/rev"LONG") como molde, y 2 cebadores cortos (for/rev"SHORT") homólogos, respectivamente, a los extremos de las secuencias de los cebadores "LONG" (tabla 1). Como resultado de las reacciones de amplificación por PCR, se obtuvieron productos de la longitud esperada, los cuales se digirieron después mediante las enzimas Sall y PstI y se ligaron con un plásmido que se replica en las células bacterianas de *Lactococcus* -
 10 pL253, digerido de antemano con las mismas enzimas. Posteriormente, las dos moléculas de ADN se recombinaron entre sí y se introdujeron mediante el método de electroporación en las células de las cepas seleccionadas de *Lactococcus lactis*, las cuales se cultivaron en medio agar M17 sólido complementado con glucosa al 0,5 % y eritromicina a una concentración final de 5 µg ml⁻¹, y las células que contenían los genes sintéticos esperados se aislaron a partir de la población cultivada mediante el método de PCR usando cebadores específicos. La
 15 coincidencia de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN clonados con las secuencias de nucleótidos de los genes sintéticos se examinó mediante la técnica de secuenciación de ADN.

[0032] Los plásmidos recombinantes apropiados resultantes se aislaron a partir de las células bacterianas de *Lactococcus* usando un método conocido y se introdujeron mediante electroporación dentro de células de otras
 20 bacterias acidolácticas, p. ej., *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

[0033] Las células de las cepas de *L. lactis* se transformaron usando una técnica de electroporación conocida (19). Las células de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se transformaron usando una técnica de electroporación conocida, según procedimientos establecidos previamente (20, 21).
 25

[0034] Otras técnicas de biología molecular usadas en el ejemplo estaban de acuerdo con la metodología convencional (22).
 30

Tabla 1

[0035] Secuencia de los cebadores ("LONG") usados como moldes para la amplificación de los genes sintéticos de neuropéptido.

Tabla 1

Nombre del neuropéptido	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (directo/inverso)
MBP21-40	FLON G_ MPB21	5' GAGTATTTCTATGGATCATGCTCGTCATG GTTTTTACCACGTCATCGTGATACTGGT ATTTTAGATTCA 3'
	RLON G_ MPB21	5' TGAATCTAAAATACCAGTATCACGATGAC GTGGTAAAAACCATGACGAGCATGATCC ATAGAAATACTC 3'
MOG35-55	FLON G_ MOG35	5' GTATTTCTATGGAAGTTGGATGGTATCGT TCACCATTTTCACGTGTTGTTCAATTATAT CGTAATGG 3'
	RLON G_ MOG35	5' CCATTACGATATAAATGAACAACACGTGA AAATGGTGAACGATACCATCCAACCTTCCT AGAAATAC 3'

Nombre del neuropéptido	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (directo/inverso)
MBP85-97	FLON G_ MPB85	5' GTATTTCTATGCCAGGATCACGTCCACAT TTAATTCGTTTATTTTCACGT 3'
	RLON G_ MPB85	5' ACGTGAAAATAAACGAATTAATGTGGAC GTGATCCTGGCATAGAAATAC 3'
PLP139-151	FLON G_ PLP139	5' GTATTTCTATGCATTCATTAGGAAAATGGT TAGGACATCCAGATAAATTT 3'
	RLON G_ PLP139	5' AAATTTATCTGGATGTCCTAACCATTTTCC TAATGAATGCATAGAAATAC 3'
PLP178-191	FLON G_ PLP17 8	5' GTATTTCTATGAATACATGGACAACATGTC AATCAATTGCTTTTCCATC 3'
	RLON G_ PLP17 8	5' GATGGAAAAGCAATTGATTGACATGTTGT CCATGTATTCATAGAAATAC 3'

Ejemplo II.

[0036] La producción de los péptidos seleccionados en células de bacterias acidolácticas se basó en la expresión de genes sintéticos en las células bacterianas mediante su cultivo en medio definido MQD (*medio químicamente definido*), complementado con celobiosa a una concentración no inferior al 0,5 %, a una temperatura que oscilaba entre 20 °C- 30°C, preferentemente a 30 °C, hasta alcanzar una densidad óptica de DO 600³ 0,6.

Ejemplo III.

10

[0037] Los estudios sobre la expresión de los genes sintéticos de los péptidos seleccionados de mielina a nivel de transcripción se llevaron a cabo usando el método de RT-PCR. El ARN total se aisló a partir de cepas bacterianas portadoras de los plásmidos recombinantes y, después de tratamiento específico, se sometió a la reacción de transcripción inversa usando cebadores inversos (revSHORT_péptido) complementarios al extremo 3' de la cadena que codifica el gen sintético (tabla 2). El ADNc obtenido se sometió a continuación a amplificación mediante la técnica de PCR clásica usando dos pares de cebadores (forSHORTUniv y revSHORT_péptido) (tabla 2). Como resultado del experimento, se obtuvieron dos fragmentos de ADN cuya longitud correspondió a la longitud de cada uno de los genes.

20 **Tabla 2**

[0038] Secuencia de los cebadores ('SHORT') usados para la amplificación de genes sintéticos de neuropéptido.

Tabla 2

Nombre del neuropéptido	Nombre del cebador	Secuencia del cebador
Cebador directo universal	ForSHORTUniv	5' ACGCGTCGACAAGGAGTATTTCTA TG 3'

Nombre del neuropéptido	Nombre del cebador	Secuencia del cebador
MBP21-40	RevSHORT_ MBP21	5' AACTGCAGTTATTATGAATCTAAAA TACCAG 3'
MOG35-55	revSHORT_ MOG35	5' AACTGCAGTTATTATTTTCCATTAC GATA 3'
MBP85-97	revSHORT_ MBP85	5' AACTGCAGTTATTAACGTGAAAATA AACG 3'
PLP139-151	revSHORT_ PLP139	5' AACTGCAGTTATTA AAAATTTATCTG G 3'
PLP178-191	revSHORT_ PLP178	5'AACTGCAGTTATTATTTTGATGGA AAAGC 3'

Ejemplo IV.

5 **[0039]** Los estudios sobre la expresión de los genes sintéticos de los péptidos seleccionados de mielina a nivel de traducción se llevaron a cabo mediante el método de inmunotransferencia, usando extractos de proteína obtenidos mediante métodos conocidos a partir de cultivos de células bacterianas portadoras de los plásmidos recombinantes, suspendidas en tampón PBS, pH 7,4, y anticuerpos específicos adecuados disponibles en el mercado.

Ejemplo V.

10

[0040] La región promotora del gen *ptcB* se amplificó mediante el método de PCR usando ADN genómico de la cepa IL 1403 de *L. lactis* como molde, y cebadores específicos (tabla 3). Como resultado de la amplificación por PCR, se obtuvo un producto de longitud esperada, el cual se digirió a continuación con las enzimas NciI y VspI y se ligó con el plásmido pIL253, que se replica en las células de la bacteria *Lactococcus*, digerido de antemano con las mismas 15 enzimas. El ADN recombinante se introdujo mediante electroporación dentro de células de la cepa de *L. lactis*, las cuales se cultivaron en medio agar M17 sólido complementado con glucosa al 0,5 % y eritromicina a una concentración final de 5 µg ml⁻¹, y, a partir de la población de células cultivadas, se aislaron las células que contenían la región promotora del gen *ptcB* usando el método de PCR y cebadores específicos.

20 **[0041]** Las células de las cepas de *L. lactis* se transformaron usando la técnica de electroporación (19).

[0042] Otras técnicas de biología molecular usadas en el ejemplo estaban de acuerdo con la metodología convencional (22).

25 **Tabla 3**

[0043] Secuencia de los cebadores usados para la amplificación de la región promotora del gen *ptcB*.

Tabla 3

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
ptcBfor	5' GCGATTAATGTCGCCTAAAGGTTGC 3'

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
ptcBrev	<p style="text-align: center;">5'</p> <p style="text-align: center;">AATCCCGGCGTTTTATAATTTAACG</p> <p style="text-align: center;">TTC 3'</p>

Ejemplo VI.

[0044] Los genes de péptido sintéticos se amplificaron mediante el método de PCR usando cebadores específicos 'SHORT' (tabla 2) y después se ligaron con un vector que se replica en las células de bacterias de *Escherichia coli* - pGEMT-Easy. El ADN recombinante se introdujo mediante el método de electroporación dentro de células de la cepa de *E. coli*, las cuales se cultivaron en medio agar LB complementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg ml⁻¹, y, a partir de la población de células cultivadas, se aislaron las células que contenían los genes sintéticos esperados usando el método de PCR y cebadores específicos. La coincidencia de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN clonados con las secuencias de nucleótidos de los genes sintéticos se examinó mediante la técnica de secuenciación de ADN.

[0045] Las células de *E. coli* se transformaron usando la técnica de electroporación (22).

[0046] Otras técnicas de biología molecular usadas en los ejemplos estaban de acuerdo con la metodología convencional (22).

Ejemplo VII.

[0047] La estructura de la secuencia de nucleótidos de los genes sintéticos de los péptidos de mielina seleccionados, así como la de la región promotora del gen *ptcB*, de acuerdo con la invención, se confirmó mediante secuenciación de los fragmentos de ADN usando el equipo de reactivos BigDye Terminator (Promega, EE.UU.) y el aparato de secuenciación ABI377 (Applied Biosystem, EE.UU.), y los plásmidos recombinantes como moldes, así como cebadores complementarios a los extremos de cada uno de los insertos. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron usando el programa BLAST (23).

Tabla 4

Cepas y plásmidos

30

[0048]

Tabla 4

Cepa	genotipo	origen
<i>Lactococcus lactis</i>		
IL1403	Cepa de laboratorio sin plásmido	(24)
IBB360	Cepa con posibles propiedades autolíticas	Colección J. Bardowski-IBB PAN
IBB477	Cepa con posibles propiedades adhesivas, Tc ^r	Colección J. Zycka-Krzesinska-IBB PAN
<i>Bifidobacterium</i>		
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> M115	Aislado de intestino humano; sin plásmido	Colección IPLA Laboratory
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NCFB1193	Colección NCFB
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	supE Q(hsdM-mcrB)(rk-mk-McrB -)thi Q(lac-proAB)F'[traD36 lacIq lacZ QM15 proA+B+]	(25)
Plásmido		
pIL253	Ery ^r , vector para la clonación de genes en bacterias de <i>Lactococcus</i>	(26)
pIL253_p[<i>ptcB</i>]	Ery ^r , vector para la clonación de genes en bacterias de <i>Lactococcus</i> , con región promotora regulada del gen <i>ptcB</i>	Este trabajo
pGEMT-Easy	Amp ^R , vector para la clonación de genes en bacterias de <i>Escherichia</i>	Promega

Cepa	genotipo	origen
<i>Lactococcus lactis</i>		
* Ery ^r - resistencia a eritromicina Amp ^r - resistencia a ampicilina		

Texto libre de listado de secuencias

MBP21-40:

5

[0049]

ATGGATCATGCTCGTCATGGTTTTTTACCACGTCATCGTGATACTGGT
ATTTTAGATTCA

10 **fórmula 1**

MDHARHGFLPRHRDTGILDS

fórmula 1a

MOG35-55:

15

[0050]

ATGGAAGTTGGATGGTATCGTTCACCATTTTCACGTGTTGTTCAATTA
TATCGTAATGGAAAA

20 **fórmula 2**

MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK

fórmula 2a

MBP85-97:

25

[0051] CCAGGATCACGTCCACATTTAATTCGTTTATTTTCACGT

fórmula 3

30 **[0052]** PGSRPHLIRLFSR

fórmula 3a

PLP139-151:

35

[0053] CATTATTAGGAAAATGGTTAGGACATCCAGATAAATTT

fórmula 4

40 **[0054]** HSLGKWLGHDPDKF

fórmula 4a

PLP178-191:

ATGAATACATGGACAACATGTCAATCAATTGCTTTTCCATCAAAA

45 **fórmula 5**

NTWTTCCQSIAPFSK

fórmula 5a

Fragmento de ADN que contiene el gen sintético del péptido MBP 21-40

50

[0055]

5'ACGCGTCGACAAGGAGTATTTCTATGGATCATGCTCGTCATGGTTTT
TTACCACGTCATCGTGATACTGGTATTTTAGATTCATAATAACTGCAGT
T3'

fórmula 6

5 Fragmento de ADN que contiene el gen sintético del péptido MOG35-55

[0056]

5'ACGCGTCGACAAGGAGTATTTCTATGGAAGTTGGATGGTATCGTTC
ACCATTTTCACGTGTTGTTTCATTATATCGTAATGGAAAATAACTG
CAGTT3'

10 fórmula 7

Fragmento de ADN que contiene el gen sintético del péptido MBP85-97

[0057]

15

5'ACGCGTCGACAAGGAGTATTTCTATGCCAGGATCACGTCCACATT
AATTCGTTTATTTTCACGTTAATAACTGCAGTT3'

fórmula 8

20 Fragmento de ADN que contiene el gen sintético del péptido PLP139-151

[0058]

5'ACGCGTCGACAAGGAGTATTTCTATGCATTCATTAGGAAAATGGTTA
GGACATCCAGATAAATTTTAATAACTGCAGTT3'

25

fórmula 9

Fragmento de ADN que contiene el gen sintético del péptido PLP178-191

30 [0059]

5'ACGCGTCGACAAGGAGTATTTCTATGAATACATGGACAACATGTCA
ATCAATTGCTTTTCCATCAAATAATAACTGCAGTT3'

fórmula 10

35

región promotora del gen *ptcB*

[0060]

GTCGCCTAAAGGTTGCTATAAAGCGAAAAATAAACTAATTAACAAATT
ATATAAAGCACTTTCAAAAAATAGATAACGCTTGCATTATGAAAATGAA
AACGTTATAATTATTTTTATAAAGAACGTTAAATTATAAAACG

fórmula 11

5 Fragmento de ADN que contiene la región promotora del gen *ptcB*

[0061]

GCGATTAATGTCGCCTAAAGGTTGCTATAAAGCGAAAAATAAACTAAT
TAACAAATTATATAAAGCACTTTCAAAAAATAGATAACGCTTGCATTAT
GAAAATGAAAACGTTATAATTATTTTTATAAAGAACGTTAAATTATAAAA
CGCCGGGATT

10

fórmula 12

MBP

15 [0062]

MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKRN LGELSRTTSEDNEVFGE
ADANQNGTSSQDTAVTDSKRTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFS
RDAPGREDNTFKDRPSESEDELQTIQEDSAATSESLDVMASQKRPSQRH
GSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGK
DSHHPARTAHYGSLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQQGKG
RGLSLSRFSWGAEGQRPGFGYGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTLISKIF
KLGGRDSRSGSPMARR

fórmula 13

20

PLP

[0063]

GLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYF
SKNYQDYEYLINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLLAEGFYTTGAVRQIFG

DYKTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHSLERVCHCLGKWLGH
DKFVGITYALTVWLLVFACSAVPVYIYFNTWTTCQSIAPSKTSASIGSL
CADARMYGVLPWNAFPKVCVGSNLLSICKTAEFQMTFHLFIAAFVGAAA
TLVSLTTFMIAATYNFAVLKLMGRGTKF

25

fórmula 14**MOG**

5 [0064]

MASLSRPSLPSCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPICALVGDEVEL
 PCRISPGKNATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRT
 ELLKDAIGEGKVTLRIRNVRFSDDEGGFTCFRRDHSYQEEAAMELKVEDPF
 YWVSPGVLVLLAVLPVLLLQITVGLVFLCLQYRLRGKLRRAEIEHLHRTFDP
 HFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLAGQFLEELRNPF

fórmula 15

10

Lista de referencias

[0065]

- 15 1. Kwiatkowska-Patzer B, Michalkiewicz J, Zielinska J, Kasarello K, Kurzepa K y Lipkowski A.W. 2009. Pig spinal cord hydrolyzate ameliorates immunological reaction in experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neurobiol Exp.* 69: 73-78.
2. Moingeon P, van Overtvelt L y Razafindratsita A. Miedzynarodowy patente n° WO2006/123230. Compositions for antigen-specific induction of tolerance.
- 20 3. Carnegie PR. 1971. Amino acid sequence of the encephalitogenic basic protein from human myelin. *Biochem. J.* 123: 57-67.
4. Stoffel W, Giersiefen H, Hillen H, Schroeder W y Tunggal B. 1985. Amino-acid sequence of human and bovine brain myelin proteolipid protein (lipophilin) is completely conserved. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366: 627-635.
- 25 5. Hilton AA, Slavin AJ, Hilton DJ y Bernard CCA. 1995. Characterization of cDNA and genomic clones encoding human myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.* 65: 309-318.
6. Kwiatkowska-Patzer B, Baranowska B, Barcikowska-Litwin M y Lipkowski AW. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat by oral administration of spinal cord protein hydrolysate, en: *Neurochemistry* (Eds. Teelken y Korf), Plenum Press, N. York 1997, págs. 137-140.
- 30 7. Libudzisz Z, Walczak P y Bardowski J. (Eds.) - Lactic acid bacteria - classification, metabolism, genetics, applications (en polaco), monograph, Edition of Technical University of odz, odz 1998, 2003 y 2004.
8. Teusink B y Smid EJ. Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. 2006. *Nat Rev Microbiol.* 4: 46-56.
9. Lin DC. 2003. Probiotics as functional foods. *Nutr Clin Pract.* 18:497-506.
- 35 10. Ouwehand AC, Salminen S e Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82: 279-89.
11. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F, Guimaraes V, Rabot S, Alcocer-Gonzalez JM, Gratadoux JJ, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra RS, Corthier G, Gruss A y Langella PA. 2005. A novel mucosal vaccine based on live lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol.* 175: 7297-302.
- 40 12. Vaughan EE, de Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD y de Vos WM. 2002. The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82: 341-52.
13. Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, Goodin DS, Pelletier D, Lincoln RR, Bucher P, Swerdlin A, Pericak-Vance MA, Haines JL y Hauser SL. Grupo de genética de la esclerosis múltiple. 2003. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am. J. Human Gen.* 72: 710-716.
- 45 14. Steinman L y Zamvil S. 2003. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nature Rev. Immun.* 3: 483-492.
15. Pedotti R, DeVoss JJ, Youssef S, Mitchell D, Wedemeyer J, Madanat R, Garren H, Fontoura P, Tsai M, Galli SJ, Sobel RA y Steinman L. 2003. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 1867-1872.
- 50 16. Anderson AC, Nicholson LB, Legge KL, Turchin V, Zaghanni H y Kuchroo K. 2000. High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein specific T cell in the periphery of naive mice: mechanism of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med.* 6: 56-61.
- 55 17. Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. 2003. Optimisation of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG(35-55) peptide in C57BL6/J strain of mice. *Journal of Autoimmunity.* 20: 51-61.

18. Zamvil SS, Nelson PA, Mitchell DJ, Knobler RL, Fritz RB y Steinman L. 1985. Encephalitogenic Tcell clones specific for myelin basic protein .An unusual bias in antigen recongnition. J Exp Med. 162: 2107-2124.
19. Holo H y Nes IF. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of Lactococcus lactis subsp. cremoris with glycine in osmotically stabilized media. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3119.
- 5 20. Álvarez-Martín P, Flórez AB, Margolles A, del Solar G y Mayo B. 2008. Improved cloning vectors for Bifidobacteria, based on the Bifidobacterium catenulatum pBC1 replicon. 74: 4656-4665.
21. Aukrust TW, Brurberg MB y Nes IF. 1995. Transformation of Lactobacillus by electroporation. Methods Mol Biol. 47: 201-208.
- 10 22. Sambrook J., Fritsche EF y Maniatis T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
23. Altschul SF, Gis W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403.
24. Chopin A, Chopin MC, Moillo-Batt A y Langella P. 1984. Two plasmid-determined restriction and modification systems in Streptococcus lactis. Plasmid 11, 260-263.
- 15 25. Gibson TJ. 1984. Studies on the Eppstein-Barr virus genome. Tesis doctoral, Universidad de Cambridge, Cambridge, Inglaterra.
- [0066]** Simon D y Chopin A. 1988. Construction of a vector plasmid family for molecular cloning in Streptococcus lactis Biochimie. 70: 559-566.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Gen sintético para su uso en la inducción de tolerancia oral en el tratamiento de la esclerosis múltiple, en el que el gen contiene el fragmento de nucleótidos MBP21-40
- 5 ATGGATCATGCTCGTCATGGTTTTTACCACGTCATCGTGATACTGGTATTTTAGATTCA (fórmula 1), que codifica un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos MDHARHGFLPRHRDTGILDS (fórmula 1a), siendo dicho péptido un fragmento de una proteína natural de mielina.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 2006123230 A [0065]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- 15 • **KWIATKOWSKA-PATZER B ; MICHALKIEWICZ J ; ZIELINSKA J ; KASARELLO K ; KURZEPA K ; LIPKOWSKI A.W.** Pig spinal cord hydrolyzate ameliorates immunological reaction in experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neurobiol Exp.*, 2009, vol. 69, 73-78 [0065]
- 20 • **CARNEGIE PR.** Amino acid sequence of the encephalitogenic basic protein from human myelin. *Biochem. J.*, 1971, vol. 123, 57-67 [0065]
- 25 • **STOFFEL W ; GIERSIEFEN H ; HILLEN H ; SCHROEDER W ; TUNGGAL B.** Amino-acid sequence of human and bovine brain myelin proteolipid protein (lipophilin) is completely conserved. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1985, vol. 366, 627-635 [0065]
- 30 • **HILTON AA ; SLAVIN AJ ; HILTON DJ ; BERNARD CCA.** Characterization of cDNA and genomic clones encoding human myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.*, 1995, vol. 65, 309-318 [0065]
- 35 • **Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat by oral administration of spinal cord protein hydrolysate. KWIATKOWSKA-PATZER B ; BARANOWSKA B ; BARCIKOWSKA-LITWIN M ; LIPKOWSKI AW.** Neurochemistry. Plenum Press, 1997, 137-140 [0065]
- 40 • **Lactic acid bacteria - classification, metabolism, genetics, applications (in polish), monograph. 1998 [0065]**
- 45 • **TEUSINK B ; SMID EJ.** Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol.*, 2006, vol. 4, 46-56 [0065]
- **LIN DC.** Probiotics as functional foods. *Nutr Clin Pract.*, 2003, vol. 18, 497-506 [0065]
- 50 • **OUWEHAND AC ; SALMINEN S ; ISOLAURI E.** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, vol. 82, 279-89 [0065]
- 55 • **BERMUDEZ-HUMARAN LG ; CORTES-PEREZ NG ; LEFEVRE F ; GUIMARAES V ; RABOT S ; AL-COCER-GONZALEZ JM ; GRATADOUX JJ ; RODRIGUEZ-PADILLA C ; TAMEZ-GUERRA RS ; CORTIER G.** A novel mucosal vaccine based on live lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol.*, 2005, vol. 175, 7297-302 [0065]
- **VAUGHAN EE ; DE VRIES MC ; ZOETENDAL EG ; BEN-AMOR K ; AKKERMANS AD ; DE VOS WM.** The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, vol. 82, 341-52 [0065]
- **BARCELLOS LF ; OKSENBERG JR ; BEGOVICH AB ; MARTIN ER ; SCHMIDT S ; VITTINGHOFF E ; GOODIN DS ; PELLETIER D ; LINCOLN RR ; BUCHER P.** Multiple Sclerosis Genetics Group. 2003. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am. J. Human Gen.*, vol. 72, 710-716 [0065]
- **STEINMAN L ; ZAMVIL S.** Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nature Rev. Immun.*, 2003, vol. 3, 483-492 [0065]
- **PEDOTTI R ; DEVOSS JJ ; YOUSSEF S ; MITCHELL D ; WEDEMEYER J ; MADANAT R ; GARREN H ; FONTOURA P ; TSAI M ; GALLI SJ.** Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2003, vol. 100, 1867-1872 [0065]
- **ANDERSON AC ; NICHOLSON LB ; LEGGE KL ; TURCHIN V ; ZAGHNANNI H ; KUCHROO K.** High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein specific T cell in the periphery of naive mice: mechanism of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med.*, 2000, vol. 6, 56-61 [0065]
- **COSTA O ; DIVOUX D ; ISCHENKO A ; TRON F ; FONTAINE M.** Optimisation of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG(35-55) peptide in C57BL/6J strain of mice. *Journal of Autoimmunity*, 2003, vol. 20, 51-61 [0065]
- 60

- 5
10
15
20
- **ZAMVIL SS ; NELSON PA ; MITCHELL DJ ; KNOBLER RL ; FRITZ RB ; STEINMAN L.** Encephalitogenic Tcell clones specific for myelin basic protein .An unusual bias in antigen recongnition. *J Exp Med.*, 1985, vol. 162, 2107-2124 **[0065]**
- **HOLO H ; NES IF.** High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, vol. 55, 3119 **[0065]**
- **ÁLVAREZ-MARTÍN P ; FLÓREZ AB ; MARGOLLES A ; DEL SOLAR G ; MAYO B.** *Improved cloning vectors for Bifidobacteria, based on the Bifidobacterium catenulatum pBC1 replicon*, 2008, vol. 74, 4656-4665 **[0065]**
- **AUKRUST TW ; BRURBERG MB ; NES IF.** Transformation of *Lactobacillus* by electroporation. *Methods Mol Biol.*, 1995, vol. 47, 201-208 **[0065]**
- **SAMBROOK J. ; FRITSCH E F ; MANIATIS T.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 **[0065]**
- **ALTSCHUL SF ; GIS W ; MILLER W ; MYERS EW ; LIPMAN DJ.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403 **[0065]**
- **CHOPIN A ; CHOPIN MC ; MOILLO-BATT A ; LANGELLA P.** Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid*, 1984, vol. 11, 260-263 **[0065]**
- Studies on the Epstein-Barr virus genome. **GIBSON TJ.** Ph.D. Thesis. Cambridge University, 1984 **[0065]**
- **SIMOND ; CHOPIN A.** *Construction of a vector plasmid family for molecular cloning in Streptococcus lactis Biochimie*, 1988, vol. 70, 559-566 **[0066]**