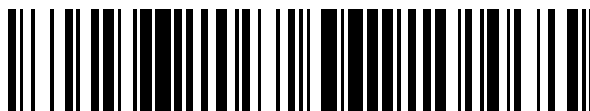


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 938**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/335 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2010** **E 10772573 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 2424885**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de tratamiento de trastornos que implican apoptosis de células epiteliales**

30 Prioridad:

28.04.2009 US 173337 P

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

05.05.2016

73 Titular/es:

VANDERBILT UNIVERSITY (100.0%)
305 Kirkland Hall, 2201 West End Avenue
Nashville, TN 37240, US

72 Inventor/es:

POLK, D. BRENT y
YAN, FANG

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 568 938 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

Composiciones y procedimientos de tratamiento de trastornos que implican apoptosis de células epiteliales

Antecedente de la invención**1. Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere en líneas generales a los campos de biología celular, bioquímica y medicina. Más particularmente, se refiere al uso de factores solubles producidos por bacterias probióticas para la inhibición de la apoptosis de células epiteliales, promoción de la integridad de la barrera epitelial, y tratamiento o prevención de trastornos gastrointestinales.

2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) se caracterizan por producción aumentada de citoquinas inflamatorias, apoptosis de células epiteliales e infiltración de células inmunitarias, que conducen a alteración de la integridad del epitelio intestinal (Sartor, 2002). Por lo tanto, la remisión de estos trastornos requiere tanto apoptosis disminuida como restitución del epitelio dañado. Los recientes estudios revelan varios enfoques terapéuticos potenciales para inducir restitución del epitelio dañado. Se ha informado de que los factores de crecimiento (El-Assal y Besner, 2005; Matsuura y col., 2005; McCole y col., 2005; Sinha y col., 2003) y las citoquinas (Marini y col., 2003; Zeissig y col., 2004) modulan estos procesos regulando la proliferación (Matsuura y col., 2005), migración (El-Assal y Besner, 2005), y apoptosis (Marini y col., 2003; Zeissig y col., 2004).

- 20 Cada vez más evidencias sugieren que algunas bacterias comensales potencian la homeostasis del epitelio intestinal y la integridad de la barrera. De hecho, las bacterias comensales regulan varios procesos del huésped, incluyendo nutrición, desarrollo, y respuestas inmunitarias, que son relevantes tanto para la salud como para la enfermedad (Yan y Polk, 2004). Por lo tanto, la manipulación de la flora bacteriana intestinal se ha usado como enfoque sanitario alternativo para la prevención y tratamiento de enfermedad (Sartor, 2004). Los microorganismos vivos en el tracto intestinal que benefician al huésped se llaman probióticos (Lilly y Stillwell, 1965). Recientes estudios indican que algunas especies de *Lactobacillus* funcionan como probióticos e inducen remisión sostenida en colitis ulcerosa y pouchitis (Borody y col., 2003; Dieleman y col., 2003; Mimura y col., 2004; Schultz y col., 2004). *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), una bacteria usada en la producción del yogur, es una de las cepas mejor estudiadas de *Lactobacillus* en ensayos clínicos para EII.

- 30 La primera diana supuesta de las acciones probióticas es la célula del epitelio intestinal. Las bacterias probióticas estimulan varias respuestas protectoras de las células del epitelio intestinal, incluyendo potenciación de la función de barrera epitelial (Resta-Lenert y Barrett, 2003; Resta-Lenert y Barrett, 2006), síntesis y secreción de mucina (Mack y col., 2003; Otte y Podolsky, 2004), inhibición de unión de *E. coli* enteropatógena (Mack y col., 2003), y supervivencia celular (Yan y Polk, 2002). Sin embargo, los mecanismos que regulan las respuestas epiteliales a los probióticos son complejas y en gran medida desconocidas. Los inventores han usado LGG para investigar los mecanismos moleculares por los cuales los probióticos regulan las células del epitelio intestinal, y han informado previamente de que LGG previene la apoptosis inducida por citoquinas en células del epitelio intestinal tanto humano como de ratón a través de la activación de Akt y la inhibición de la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 (Yan y Polk, 2002). Akt desempeña un papel central en la promoción de la supervivencia celular por inactivación de varias rutas proapoptóticas, incluyendo BAD, caspasa 9 y caspasa 3, y estimulando la proliferación celular mediante la activación de reguladores del ciclo celular, tales como ciclina/CDK (Amaravadi y Thompson, 2005; Hanada y col., 2004). Han informada adicionalmente de que factores solubles recuperados del sobrenadante de caldo de cultivo de LGG (LGG-s) activan Akt de un modo dependiente de fosfatidilinositol-3'-quinasa (PI3K) y previenen la apoptosis mediada por citoquinas (Yan y Polk, 2002). Un informe reciente ha demostrado que factores solubles presentes en medio condicionado de LGG (LGG-CM) inducen síntesis de proteína de choque térmico citoprotectora en células del epitelio intestinal (Tao y col., 2006). Sin embargo, según el conocimiento de los inventores, los componentes específicos de LGG-s que promueven la salud del epitelio intestinal no se han identificado. Por lo tanto, se necesita la purificación y caracterización de proteínas solubles derivadas de LGG que regulan la proliferación y supervivencia de las células del epitelio intestinal. Por lo tanto, se necesita la purificación y caracterización de proteínas solubles derivadas de LGG que regulan la proliferación y supervivencia de las células del epitelio intestinal para separar el componente específico que media los efectos del epitelio intestinal a partir de otros componentes que pueden tener efectos inseguros, fuera de rango, o amortiguadores, o que pueden hacer que se produzca o purifique de forma más difícil el péptido.

Sumario de la invención

- 55 Por tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona péptido de *Lactobacillus* que comprende un fragmento de p40, en el que el fragmento comprende la SEQ ID NO: 6, y en el que el péptido contiene no más de 100 aminoácidos de la molécula p40 definida por la SEQ ID NO: 2. El fragmento de p40 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6 (es decir, los restos 29-60 de la molécula p40), y puede comprender opcionalmente la secuencia de la SEQ ID NO: 4 (es decir, los restos 1-60 de la molécula p40). El péptido puede contener no más de 32, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 aminoácidos de la molécula p40

definida por la SEQ ID NO: 2, y puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, uno o más D-aminoácidos, un dominio de direccionamiento o un dominio de estabilización. El péptido puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, uno o más D-aminoácidos, un dominio de direccionamiento o un dominio de estabilización.

- 5 En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido de *Lactobacillus* del primer aspecto de la presente invención dispersado en un tampón, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto de realización de la presente invención, se proporciona un segmento de ácido nucleico aislado y purificado que codifica un péptido de *Lactobacillus* del primer aspecto de la presente invención. Por consiguiente, el segmento de ácido nucleico aislado y purificado comprende secuencias de ácido nucleico correspondientes a no más de aproximadamente 100 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 e incluyendo al menos la secuencia de la SEQ ID NO: 6, y opcionalmente la secuencia de la SEQ ID NO: 4. El segmento de ácido nucleico puede codificar 32, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, uno o más de aminoácidos, un dominio de direccionamiento o un dominio de estabilización. El segmento de ácido nucleico comprende adicionalmente un promotor que dirige la transcripción del segmento de ácido nucleico, que puede obtenerse de la SEQ ID NO: 1. El segmento de ácido nucleico también puede comprender adicionalmente un vector replicable, tal como un plásmido o un vector vírico, incluyendo un vector de baculovirus.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una célula huésped que comprende el segmento de ácido nucleico aislado y purificado del tercer aspecto de la presente invención. La célula huésped puede ser una célula bacteriana, tal como una célula de *Lactobacillus*, o una célula eucariota, tal como una célula de levadura o una célula de insecto.

En un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona la composición farmacéutica del segundo aspecto de la presente invención para su uso en la inhibición de la apoptosis de células epiteliales inducida por citoquina y/o la promoción del crecimiento de células epiteliales en un sujeto. El uso definido por el quinto aspecto de la presente invención puede comprender adicionalmente administrar al sujeto un agonista de EGFR o antibiótico. El sujeto a tratarse de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención puede ser un ser humano, una rata, un ratón, una oveja, un perro, un gato, un conejo. El sujeto puede padecer una infección gastrointestinal, tal como cólera, infección por rotavirus o infección por *E. coli* enterotoxigénica. El sujeto puede padecer un trastorno gastrointestinal, tal como enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, enterocolitis necrotizante, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enteropatía por VIH, gastritis por *Helicobacter*, trastornos del intestino inducidos por radiación o radioterapia, o enteropatía/enteritis por AINE. La célula epitelial puede estar comprendida dentro de tejido cutáneo, tejido de la córnea o tejido pulmonar, dentro de un tejido inflamado, dentro de tejido cardíaco, vasculatura, músculo o una articulación, o dentro de tejido lesionado por citoquinas.

En un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona la composición farmacéutica del segundo aspecto de la presente invención para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad gastrointestinal en un sujeto.

En un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad gastrointestinal en un sujeto, en el que la composición farmacéutica comprende un segmento de ácido nucleico aislado y purificado de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención dispersado en un tampón, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, estando situado el segmento de ácido nucleico bajo el control de un promotor.

Se contempla que cualquier uso o composición descrita en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro uso o composición descrita en el presente documento.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno".

Se contempla que cualquier realización analizada en esta memoria descriptiva puede implementarse con respecto a cualquier procedimiento o composición de la invención, y *viceversa*. Además, pueden usarse composiciones y kits de la invención para conseguir procedimientos de la invención.

50 Durante toda esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el procedimiento que se está empleando para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

Breve descripción de los dibujos

55 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación de la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente

documento.

FIG. 1A-D - Purificación y secuenciación de p75 y p40 purificados del LGG-s. Se cargó sobrenadante de cultivo de LGG filtrado en una columna de intercambio catiónico. Las proteínas unidas al medio de intercambio se eluyeron usando tampón Tris que contenía concentraciones secuenciales de NaCl (100-800 mM). Las proteínas eluidas se separaron por SDS-PAGE y se tiñeron con el kit de tinción con azul coloidal (FIG. 1A, carriles 3 y 4). Se muestras proteínas presentes en las fracciones concentradas de caldo y LGG-s usando un filtro de punto de corte de 5 kDa (FIG. 1A, carriles 1 y 2 respectivamente). Se generaron anticuerpos policlonales contra p75 o p40 como se detalla en procedimientos, y se usaron en análisis de transferencia de Western (FIG. 1B Y FIG. 1C). Se detectaron secuencias N-terminales (negrita) y secuencias peptídicas internas (subrayadas) de p75 y p40 por degradación de Edman o análisis MALDI-TOF/EM/EM y CL/EM/EM, respectivamente (FIG. 1D). Las secuencias genéticas de LGG que codifican p75 y p40 se determinaron como se describe en los procedimientos, y se dedujeron las secuencias predichas de aminoácidos a partir de las secuencias de nucleótidos (FIG. 1D).

FIG. 2A-D - p75 y p40 estimulan la activación de Akt en células epiteliales de colon de ratón y humano. Se trataron células de colon de ratón adulto joven (YAMC) (FIG. 2A Y FIG. 2D) y HT29 (FIG. 2B Y FIG. 2C) con p75 o p40 purificado a las concentraciones indicadas durante 2 horas en presencia o ausencia de pretratamiento de 30 minutos de inhibidor de PI3K, LY294002 (10 μ M, FIG. 2C). Se detectó activación de Akt, p38, ERK1/2 MAPK y degradación de I κ B α por análisis de transferencia de Western de lisados celulares con anticuerpos indicados. Los datos en esta figura son representativos de cinco experimentos diferentes.

FIG. 3A-D - p75 y p40 inhiben la apoptosis inducida por citoquinas en células del epitelio intestinal. Se trataron células KSR⁺MCE (FIG. 3A y FIG. 3B) o células HT29 (FIG. 3C y FIG. 3D) con factor de necrosis tumoral (TNF) (100 ng/ml) durante 6 horas, o la combinación de "cóctel de citoquinas" de TNF (100 ng/ml), IL-1 α (10 ng/ml) y γ -IFN (100 ng/ml) durante 16 horas, respectivamente, en presencia o ausencia de pretratamiento de 1 hora con LGG viable, p75 (100 ng/ml) o p40 (10 ng/ml). Se mantuvieron LGG, p75 y p40 durante el curso completo del tratamiento con citoquinas en todos los experimentos mostrados en este artículo. Las células KSR⁺MCE se fijaron para TUNEL con núcleos apoptóticos marcados con FITC y tinción DAPI (FIG. 3A). Se tomaron imágenes marcadas FITC y DAPI del mismo campo. Las flechas indican núcleos apoptóticos representativos. Se muestra el porcentaje de células que experimenta apoptosis (FIG. 3B). Las células HT29 se disociaron y tiñeron con Anexina V-FITC y yoduro de propidio, y se analizaron por citometría de flujo (FIG. 3C). Los resultados se mostraron como diagramas de densidad con Anexina V-FITC frente a yoduro de propidio (FIG. 3D). Las células viables tienen baja tinción con Anexina V-FITC y baja tinción con yoduro de propidio (cuadrante izquierdo inferior), las células apoptóticas prematuras tienen alta tinción con Anexina V-FITC y baja tinción con yoduro de propidio (cuadrante derecho inferior), las células apoptóticas tardías tienen alta tinción en Anexina V-FITC y alta tinción con yoduro de propidio (cuadrante derecho superior), las células necróticas tienen baja tinción con Anexina V-FITC y alta tinción con yoduro de propidio (cuadrante izquierdo superior). Las poblaciones de células apoptóticas prematuras en el cuadrante derecho inferior se muestran en (FIG. 3D). *, $p < 0,01$ en comparación con TNF-(B) o el "cóctel de citoquinas" (FIG. 3D), respectivamente. Los experimentos en esta figura se realizaron en al menos tres ocasiones diferentes.

FIG. 4 - p75 y p40 rescatan el daño epitelial inducido por TNF en explantes de colon de ratón cultivados. Se cultivaron explantes de colon derivados de ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad en DMEN que contenía PBS al 0,5 % y se trataron con TNF (100 ng/ml) durante 24 horas en presencia o ausencia de LGG, p75 (100 ng/ml) o p40 (10 ng/ml). Se tiñeron secciones tisulares incrustadas en parafina con hematoxilina y eosina para evaluación por microscopia óptica del daño epitelial (aumento 10X). Las imágenes mostradas son representativas de siete ratones en cada grupo.

FIG. 5A-D - p75 y p40 inhiben la apoptosis inducida por TNF en explantes de colon de ratón cultivados. Se trataron explantes de colon de ratón como en la FIG. 4 con TNF (50 ng/ml, TNF50 o 100 ng/ml, TNF100) durante 24 horas en presencia o ausencia de LGG, p75 (100 ng/ml) o p40 (10 ng/ml). Se estudiaron secciones tisulares incrustadas en parafina para apoptosis usando tinción ISOL. Los núcleos apoptóticos marcados con peroxidasa se visualizaron usando microscopio DIC (FIG. 5A). La actividad caspasa 3 se determinó por inmunohistoquímica usando anticuerpo anti caspasa 3 activa (FIG. 5C). Se muestra el porcentaje de criptas con núcleos apoptóticos indicados (FIG. 5B) o célula positivas a caspasa 3 activa (FIG. 5D). Las flechas indican ejemplos de células positivas a ISOL o caspasa 3. El porcentaje mostrado aquí es el promedio representativo de cinco experimentos independientes. Todas las imágenes en esta figura se tomaron con aumento 40X.

FIG. 6A-C - p75 y p40 promueven proliferación de células del epitelio intestinal. Se trataron células YAMC sembradas en placa de 96 pocillos con LGG p74 (100 ng/ml), o p40 (10 ng/ml) durante 24 horas. Al final del tratamiento se contaron las células viables usando ensayos basados en MTS. El cambio en la cantidad de células de control desde el inicio hasta el final del experimento se normalizó como el 100 %. Se informó de los cambios en las células tratadas como un porcentaje respecto al control no tratado (FIG. 6A). Las células cultivadas en portaobjetos de cámara tratadas como se indica se inmunotiñeron con anticuerpo anti antígeno nuclear de célula proliferativa (PCNA). Se observaron células positivas marcadas con peroxidasa, indicadas por flechas, por microscopia DIC (FIG. 6B). Se contaron al menos 500 células para determinar el porcentaje de células PCNA positivas (FIG. 6C). *, $p < 0,01$, #, $p < 0,001$ en comparación con el control. Los datos en esta figura representan a al menos tres experimentos diferentes.

FIG. 7A-E - La inmunorreducción de p75 y p40 bloquea los efectos antiapoptóticos del medio de cultivo celular (CM) condicionado por LGG en células epiteliales de colon. Se realizó inmunorreducción de p75 y p40 por inmunoprecipitación secuencial de LGG-CM con anticuerpos anti-p75 y p40, caracterizados en las FIG. 1A-D,

para retirar tanto p75 como p40 de LGG-CM. Se usaron sueros preinmunes como control. Las proteínas presentes en LGG-CM, LGG-CM inmunorreducido con anticuerpos (LGG-CM reducción) o sueros preinmunes (LGG-CM preinmune) se separaron por SDS-PAGE para análisis de transferencia de Western con anticuerpos anti-p75 y p40 (FIG. 7A). LGG-CM, LGG-CM reducción y LGG-CM preinmune se usaron para tratar células YAMC para detectar la activación de Akt como se muestra en las FIG. 2A-D (FIG. 7B), o explantes de colon de ratón C57BL/6 descritos en las FIG. 5A-D en presencia o ausencia de TNF (100 ng/ml) durante 24 horas. Se tiñeron secciones tisulares incrustadas en parafrina con hematoxilina y eosina para evaluación por microscopía óptica del daño epitelial (FIG. 7C, aumento 10X), y tinción ISOL para detectar apoptosis de células epiteliales usando microscopía DIC (FIG. 7D, aumento 40X). Se muestra el porcentaje de criptas con células apoptóticas indicadas (FIG. 7E). Los datos representan valores medios de al menos tres experimentos.

FIG. 8A-D - La producción de p75 y p40 por lactobacilos es específica de cepa. Se separaron proteínas concentradas recuperadas de los medios de cultivo celular condicionados bacterianos indicados usando un filtro de punto de corte de 5 kDa por SDS-PAGE y se tiñeron con el kit de tinción con azul coloidal (FIG. 8A), y se realizó análisis de transferencia de Western de estas proteínas con anticuerpos anti-p75 y anti-p40 (FIG. 8B). Para ensayar los efectos de los factores solubles derivados de bacterias sobre células de colon, se separaron las bacterias indicadas de las células YAMC por filtros de 0,2 µm durante experimentos de cocultivo durante dos horas. Se recogieron lisados celulares y se determinó la activación de Akt como en las FIG. 2A-D (FIG. 8). Para ensayar los efectos de estos factores solubles sobre la prevención de la apoptosis, las bacterias se separaron en cocultivos de transpocillo como en C, con células HT29 durante 1 hora seguido por cotratamiento de 16 horas con "cóctel de citoquinas" que contiene TNF (100 ng/ml), IL-1α (10 ng/ml) y γ-IFN (100 ng/ml). Las células después se prepararon para ensayos de apoptosis usando tinción con Anexina V-FITC como en la FIG. 3A-D. Se muestra el porcentaje de las poblaciones de células apoptóticas prematuras (FIG. 8D). LC334: *Lactobacillus casei* 334, LC393: *Lactobacillus casei* 393, LA: *Lactobacillus acidophilus*. *, $p < 0,01$, en comparación con TNF/IL-1α/γ-IFN. Los datos en esta figura representan tres experimentos diferentes.

FIG. 9 - p75 y p40 activan el receptor de EGF en células YAMC. Las células se trataron con p75 (100 ng/ml) o p40 (10 ng/ml) durante 1 hora en presencia o ausencia de pretratamiento de 30 minutos de inhibidor de tirosina quinasa AG1478 (10 nM). Se recogieron los lisados celulares para análisis de transferencia de Western para detectar la activación del receptor de EGF usando anticuerpo anti-EGFR-fosfo-Tyr1068, y la expresión del receptor de EGFR usando anticuerpo anti-EGFR.

FIG. 10A-B - El receptor de EGF media la activación por p75 y p40 de Akt. Se trataron células YAMC y EGFR^{-/-} MCE con reexpresión de wtEGFR, kiEGFR o vector solamente con p75 (100 ng/ml) o p40 (10 ng/ml) o como se indica en la FIG. 10A) durante 1 h. Se detectó activación de Akt por análisis de transferencia de Western de lisados celulares usando anticuerpo anti-Akt Ser473 (P-Akt). Se detectaron niveles de EGFR y Actina usando anticuerpos anti-EGFR y anti-Actina respectivamente.

FIG. 11A-B - El extremo aminoterminal de la proteína p40 derivada de LGG activa el receptor de EGF y Akt y previene la apoptosis inducida por citoquinas en células de epitelio intestinal. (FIG. 11A) p40-FL (10 ng/ml) y p40 1-60aa (10 ng/ml) se usaron para tratar células HT29, una línea celular de carcinoma epitelial de colon humano durante 1 hora. Se detectó activación de EGFR y Akt por análisis de transferencia de Western de lisados celulares totales usando anticuerpos fosfoespecíficos contra EGFR-Tyr1068 y Akt-Ser 473 (P-Akt), respectivamente. (FIG. 11B) se trataron células HT29 con un cóctel de citoquinas que contenía TNF (100 ng/ml), IL-1α (10 ng/ml) y γ-IFN (100 ng/ml) en presencia o ausencia de un inhibidor de quinasa de EGFR (AG1478, 100 nM) durante 16 horas, con o sin pretratamiento de 1 hora de p40-FL (10 ng/ml) y p40 1-60aa (10 ng/ml). Se mostró el porcentaje de células que experimentan apoptosis.

FIG. 12 - Generación de proteína p40 marcada con His recombinante. Se muestra el procedimiento para la generación de péptidos recombinantes p40 marcados con His. Se separaron las fracciones proteicas eluidas de columna Ni-MAC por SDS-PAGE y se transfirieron usando anticuerpos anti-p40 y anti-His. FL: longitud completa, p40-N: 1-180 aa N-terminales, p40-C: 181-412 aa C-terminales.

FIG. 13 - p40 1-180 aa N-terminal activa el receptor de EGF (EGFR) y Akt en células del epitelio intestinal. Se trataron células epiteliales de colon de ratón adulto joven (YAMC) con péptidos p40 de longitud completa marcado con His, de 1-180 aa N-terminales, y de 181-412 aa C-terminales durante 1 hora. Se detectó activación de EGFR y Akt por análisis de transferencia de Western de lisados celulares totales usando anticuerpos contra EGFR-fosfo (P)Tyr1068 y Akt-fosfo (P= Ser473, respectivamente). Se usó transferencia de actina como control de carga de proteína.

FIG. 14 - p40 1-180 aa N-terminal previene la apoptosis inducida por citoquinas en células de epitelio intestinal. Se trataron células HT29 con el "cóctel de citoquinas" que contenía TNF (100 ng/ml), IL-1α (10 ng/ml) y γ-IFN (100 ng/ml) durante 16 horas en presencia o ausencia de pre-tratamiento de 1 hora con p40-FL, p40-N 1-180 aa y p40-C 181-412 aa (10 ng/ml). Se disociaron las células HT29 y se tiñeron con Anexina V-FITC y yoduro de propidio, y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se muestran como diagramas de densidad con Anexina V-FITC frente a yoduro de propidio. Las células viables tienen baja tinción con Anexina V-FITC y baja tinción con yoduro de propidio (cuadrante izquierdo inferior), las células apoptóticas prematuras tienen alta tinción con Anexina V-FITC y baja tinción con yoduro de propidio (cuadrante derecho inferior), las células apoptóticas tardías tienen alta tinción con Anexina V-FITC y alta tinción con yoduro de propidio (cuadrante derecho superior), las células necróticas tienen baja tinción con Anexina V-FITC y alta tinción con yoduro de propidio (cuadrante izquierdo superior). Las poblaciones de células apoptóticas prematuras en el cuadrante derecho inferior se muestran en el gráfico de barras.

FIG. 15A-B - p40 1-180 aa N-terminal mejora la colitis aguda inducida por DSS en ratones. Se trataron ratones C57BL/6 con DSS al 3 % en el agua de beber durante 4 días en presencia o ausencia de sonda nasogástrica con bolitas de pectina/zeína que contienen péptido p40-FL o p40-N 1-180 aa. Se tiñeron secciones de colon incrustadas en parafina con HyE para evaluación por microscopia óptica del daño epitelial (FIG. 15A). Se muestran los valores de lesión de colon evaluados por un patólogo ciego al tratamiento (FIG. 15B).

FIG. 16A-D - p40 previene y trata la colitis inducida por DSS en ratones. Se trataron ratones con DSS al 3 % en el agua de beber durante 4 días (4D) o 7 días (7D), y se les alimentó por sonda nasogástrica con bolitas de control de pectina/zeína o bolitas que contenían p40 a 10 µg/ratón/día, empezando en el mismo día del tratamiento con DSS hasta el final del experimento (FIG. 16A y B, efecto preventivo). Se indujo colitis por tratamiento con DSS al 3 % durante 4 días, y después se administró a los ratones p40, suspensiones rectales de mesalamina (25 mg/kg de peso corporal) o suspensiones rectales de hidrocortisona (1,0 mg/kg de peso corporal) durante los siguientes 3 días antes de sacrificar los ratones (efecto de tratamiento). Los ratones de control recibieron solamente agua. Se tiñeron secciones de colon incrustadas en parafina con HyE para evaluación por microscopia óptica del daño epitelial (FIG. 16A). Se muestran los valores de lesión de colon (FIG. 16B-C). Se midió la longitud del colon (FIG. 16D). * $p < 0,05$ en comparación con los grupos de agua en ratones wt o EGFRwa2, y # $p < 0,05$ en comparación con ratones wt tratados con DSS o ratones wt tratados con DSS y bolitas de control. DSS-4D3DR: los ratones se trataron con DSS durante 4 días y se sacrificaron 3 días después de recuperación con agua. P40-3DR, cortisona-3DR, mesalamina-3DR: se administra p40, cortisona, o mesalamina a los ratones durante el periodo de recuperación de 3 días.

FIG. 17A-F - Se requiere activación de EGFR para la prevención estimulada por p40 de la apoptosis inducida por citoquinas y la alteración de las uniones ocluyentes en células epiteliales de colon. Se trataron células HT29 transfectadas con ARNip de EGFR o ARNip no dirigido (FIG. 17A-B) durante 24 horas con la combinación de "cóctel de citoquinas" de TNF (100 ng/ml), IL-1 α (10 ng/ml) y γ -IFN (100 ng/ml) durante 16 horas (FIG. 17B). Se disociaron las células HT29, se tiñeron con Anexina V-FITC y yoduro de propidio, y se analizaron usando citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de apoptosis en la (FIG. 17B). Se trataron las células HT29 con el "cóctel de citoquina" como se indica en la (FIG. 17B) durante 8 h, con o sin pre-tratamiento de 1 hora usando un inhibidor de quinasa de EGFR, AG1478 (150 nM), o un inhibidor de PI3K, Wortmanina (100 nM). Se detectó actividad caspasa en células vivas usando el kit de actividad multi-caspasa de sulforrodamina con células activas a caspasa teñidas en rojo (FIG. 17C). Se muestra el porcentaje de células con caspasa activa en la (FIG. 17D). Se cultivaron explantes de colon derivados de ratones de 6-8 semanas de edad en DMEM que contenía FBS al 0,5 % y se trataron con TNF (100 ng/ml) durante 8 h en presencia o ausencia de p40 (10 ng/ml). Se prepararon secciones tisulares incrustadas en parafina para detectar apoptosis usando tinción ISOL. Se visualizaron núcleos apoptóticos (núcleos marrones) marcados con peroxidasa usando microscopia de contraste de interferencia diferencial (DIC) (FIG. 17E). Se muestra el porcentaje de criptas con células apoptóticas en la (FIG. 17E). Se determinó la distribución ZO-1 por inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-ZO-1 y anticuerpo secundario marcado con FITC y se visualizó usando microscopia de fluorescencia (FIG. 17F). En la FIG. 17B, * $p < 0,01$ en comparación con el control en células no diana o transfectadas con ARNip de EGFR. # $p < 0,01$ en comparación con tratamiento con TNF/IL-1 IL-1 α / γ -IFN en células transfectadas con ARNip no diana. En la FIG. 17D, * $p < 0,01$ en comparación con el control, # $p < 0,05$ en comparación con tratamiento con TNF/IL-1 IL-1 α / γ -IFN, y § $p < 0,01$ en comparación con tratamiento con TNF/IL-1 IL-1 α / γ -IFN. En la FIG. 17E, * $p < 0,01$ en comparación con grupos de control en ratones wt o EGFRwa5, y # $p < 0,05$ en comparación con tratamiento con TNF en ratones wt. Para la FIG. 17E y f, n = 3 ratones para cada grupo. Se cultivaron 3 explantes de colon para cada ratón para cada condición de tratamiento.

FIG. 18A-B - Se requiere actividad quinasa de EGFR para que p40 evite la alteración inducida por DSS de la función de barrera intestinal. Los ratones se trataron con DSS durante 7 días con o sin co-tratamiento con bolitas de pectina/zeína que contenían p40. Se determinó la permeabilidad intestinal por administración rectal de FITC-dextrano en el sexto día de tratamiento con DSS. Se muestra el nivel de FITC-dextrano en suero (FIG. 18A). Se tiñeron tejidos de colon incrustados en parafina con anticuerpo anti-ZO-1 (tinción verde) y DAPI (tinción azul) (FIG. 18B). En la FIG. 18A, * $p < 0,01$ en comparación con grupos de agua en ratones wt o EGFRwa2, y # $p < 0,01$ en comparación con ratones wt tratados con DSS o ratones wt tratados con DSS y bolitas de control.

Descripción de realizaciones ilustrativas

Los probióticos han recibido recientemente atención clínica por su potencial de prevenir y/o tratar EII (Sartor, 2004). Los inventores demostraron previamente qué factores solubles derivados de LGG regulan la señalización de supervivencia celular e inhiben la apoptosis inducida por citoquinas en células del epitelio intestinal (Yan y Polk, 2002). También han informado de la purificación de dos proteínas solubles derivadas de LGG (p75 y p40) y demuestran que estas dos proteínas suprimen la apoptosis y lesión del epitelio de colon inducidas por citoquinas (Yan y col., 2007). Estos hallazgos proporcionan una base molecular para aplicación terapéutica de productos bacterianos probióticos para trastornos intestinales mediados por inflamación. Estudios *in vivo* aplicando p75 y p40 para regular respuestas inflamatorias intestinales en modelos animales deben demostrar la factibilidad de su uso como nuevos tratamientos para EII.

Aunque LGG ha demostrado inducir remisión y prevenir recidiva de EII en pacientes (Schultz y col., 2004) y en modelos animales de colitis (Dieleman y col., 2003), un ensayo clínico diseñado para ensayar la eficacia de LGG como complemento para terapia convencional en niños con enfermedad de Crohn no demostró efecto beneficioso

de LGG en el mantenimiento de la remisión (Bousvaros *y col.*, 2005). Estos resultados enfatizan un problema actual respecto al uso de terapia probiótica, concretamente la dificultad de determinar la biodisponibilidad de bacterias en el tracto gastrointestinal. Además, el uso de bacterias probióticas vivas plantea problemas a causa de varios casos de bacteremia asociada con terapia probiótica en pacientes muy jóvenes (Land *y col.*, 2005) e inmunocomprometidos (Apostolou *y col.*, 2001). Por lo tanto, un enfoque para abordar estas cuestiones puede ser el uso de proteínas derivadas de bacterias probióticas como nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de EI y otros trastornos relacionados con inflamación.

Las bacterias comensales se acoplan en intercomunicación activa con el epitelio intestinal para promover el desarrollo epitelial (Hooper *y col.*, 2001), facilitar la digestión de nutrientes y captación por células epiteliales (Xu *y col.*, 2003), y ejercer papeles protectores sobre la inflamación intestinal (Dotan y Rachmilewitz, 2005). Los mecanismos conocidos para estas funciones incluyen potenciación de la producción de citoquinas antiinflamatorias, bloqueo de la producción de citoquinas proinflamatorias, antagonismo a bacterias patogénicas (Otte y Podolsky, 2004), aumento de la producción de IgA secretora (Macpherson y Uhr, 2004) y mantenimiento de la función de barrera (Resta-Lenert y Barrett, 2003; Resta-Lenert y Barrett, 2006). Sin embargo, los factores bacterianos específicos que atenúan las respuestas inflamatorias del epitelio siguen sin estar claro.

Los inventores proporcionaron dos líneas de evidencia para apoyar la importancia de p75 y p40 en la regulación de la homeostasis intestinal (Yan *y col.*, 2007). En primer lugar, demostraron que la cepa de *Lactobacillus acidophilus*, cuyos sobrenadantes de cultivo no contienen p74 y p40, requiere contacto bacteria-célula tanto para la activación de Akt como para la supresión de la apoptosis inducida por citoquinas (FIG. 8A-D). Coherente con estos hallazgos, el grupo de Barrett informó de que la regulación por *Lactobacillus acidophilus* de la función de barrera epitelial depende de la interacción bacteria-célula (Resta-Lenert y Barrett, 2003). En segundo lugar, los experimentos de inmunorreducción muestran que la pérdida de p75 y p40 de LGG-CM elimina los efectos antiapoptóticos de LGG-CM en células epiteliales de colon (FIG. 7A-E).

Además, cuando los inventores analizaron proteínas presentes en LGG-s, aunque p75 y p40 eran las dos bandas principales observadas en análisis de SDS-PAGE de LGG-s concentrado (FIG. 1A y FIG. 8A), también contenía una proteína de 17 kDa, que se reconoció por anticuerpo anti-p40 en análisis de transferencia de Western (datos no mostrados). Ya que esta proteína de 17 kDa no se unía al medio de intercambio iónico y por lo tanto no se detectaba en las fracciones de p75 o p40 purificadas de forma cromatográfica (datos no mostrados). Los investigadores especularon que esta proteína de 17 kDa puede ser un producto de degradación de p40, pero no contiene el dominio funcional de p40 necesario para la activación de Akt.

Se caracterizó solo una ORF parcial que codifica p75 de LGG en Yan *y col.* (2007), y por lo tanto, es difícil comparar completamente la similitud entre p75 y p40. Sin embargo, dos observaciones sugieren que p75 y p40 pueden compartir algunas secuencias peptídicas idénticas: 1) análisis de péptidos digeridos con tripsina de muestras de p75 y p40 por MALDI-TOF/EM reveló varios picos idénticos en ambas preparaciones (datos no mostrados), y 2) el anticuerpo contra p40 reconocía p75 en análisis de transferencia de Western (FIG. 1B-C; FIG. 8B).

La regulación bacteriana de las respuestas del huésped a través de la producción de productos biológicamente activos se ha descrito en otras varias bacterias. *Staphylococcus aureus* produce ácido lipoteicoico para prevenir las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado a través de la activación del receptor de factor activador de plaquetas (Zhang *y col.*, 2005). Además, *Salmonella* protege a las células epiteliales de la apoptosis por activación sostenida de Akt a través de la proteína efectora SopB (Knodler *y col.*, 2005). De forma interesante, se ha informado de que factores de bajo peso molecular secretados por LGG (< 10 kDa) estimulan la producción de Hsp25 y Hsp72 por células del epitelio intestinal (Tao *y col.*, 2006). Sin embargo, los inventores descubrieron que LGG-s que contiene factores > 5 kDa, pero no filtrado de LGG-s con factores de < 5 kDa, estimula la activación de Akt (Yan y Polk, 2002). Es posible que múltiples factores en LGG-s puedan regular diferentes respuestas celulares del epitelio.

Un objetivo a largo plazo de estos estudios es comprender la base molecular de la regulación por p75 y p40 de las rutas de señalización y las respuestas celulares que conducen a inhibición de la inflamación intestinal. Las bacterias comensales inhiben las respuestas inflamatorias en parte a través de NF- κ B (Kelly *y col.*, 2004; Neish, 2004), pero los inventores no han detectado ningún efecto de LGG, p75 o p40 sobre la activación de NF- κ B en células del epitelio intestinal (FIG. 2D; Yan y Polk, 2002). Como p75 y p40 activan Akt de un modo dependiente de PI3K (FIG. 2B), es importante dilucidar los mecanismos de las rutas de señalización y las dianas corriente abajo que determinan la supervivencia celular en células del epitelio intestinal.

En la presente solicitud, los inventores han ampliado su trabajo sobre p40 identificando un fragmento de p40 que retiene en gran medida la actividad de p40 de longitud completa. Los inventores ensayaron la proteína p40 de longitud completa (FL) y los péptidos de p40 1-60 y 1-180 aa N-terminal (p40 1-60 aa; p40 1-180 aa) y descubrieron que el dominio o dominios funcionales de p40 están dentro de los 1-60 y 1-180 aa N-terminales, e indican que dicho péptido es tan potente como p40 FL para regular la señalización y respuestas celulares en células del epitelio intestinal. Dado que los primeros 28 restos de p40 son una secuencia líder putativa y parecen escindirse, también es probable que los restos 29-60 y 19-180 contengan las secuencias funcionales. Estos y otros aspectos de la invención se describen a continuación.

I. Proteínas solubles probióticas

Como se analiza a continuación, los inventores han purificado y caracterizado dos proteínas solubles de *Lactobacillus* que se denominan p75 y p40. Las secuencias N-terminales y secuencias peptídicas internas de estas proteínas se determinaron, como se describe a continuación. Se diseñaron múltiples cebadores oligonucleotídicos basados en las secuencias de los correspondientes genes de *L. casei* 334 y secuencias de ADN flanqueantes en el genoma de *L. casei* (números de acceso a NCBI GeneBank COG0791 y COG3883), y estos cebadores se usaron para amplificar por PCR secuencias relacionadas del ADN genómico de LGG.

El análisis de secuencia de un conjunto de productos de PCR clonados reveló la presencia de una ORF de 1236 pb, que codifica de forma predicha una proteína de 412 aminoácidos con una masa molecular calculada de 42 kDa (FIG. 1D). La secuencia deducida de longitud completa de aminoácidos de p40 (SEQ ID NO: 2) era un 79 % idéntica a la secuencia de una proteína de 396 aminoácidos de función desconocida de *L. casei* 334 (NCBI GeneBank COG3883).

El análisis de secuencia de otro conjunto de productos de PCR clonados reveló la presencia de una ORF parcial que era >1488 pb de longitud; la ORF de longitud completa no se amplificó satisfactoriamente. La secuencia deducida de aminoácidos de p75 estaba muy estrechamente relacionada con una hidrolasa asociada a pared celular de 493 aminoácidos de *L. casei* 334 (NCBI GeneBank COG0791), y mostraba una identidad del 70 % y del 93 % con dos regiones diferentes de esta proteína de *L. casei* 334. La masa molecular predicha de la hidrolasa asociada a pared celular de longitud completa de *L. casei* 334 (49 kDa) difiere sustancialmente de la masa molecular de la proteína p75 de LGG.

Un análisis de las secuencias génicas de p40 y p75 de LGG y las secuencias de aminoácidos N-terminales determinadas de forma experimental de las proteínas codificadas indica que ambos genes codifican proteínas con secuencias señal N-terminales. La presencia de secuencias señal es coherente con la hipótesis de que p40 y p75 se secretan de forma activa al sobrenadante de cultivo por LGG. La secuencia génica de p40 y la secuencia génica parcial de p75 no muestran relación significativa, y las secuencias de aminoácidos N-terminales determinadas de forma experimental de estas dos proteínas no están relacionadas. Por tanto, en base a los datos de secuencia disponibles, no existen evidencias que sugieran que p40 es un producto de degradación de p75. Sin embargo, es posible que pudiera haber similitud de secuencia entre p40 y la parte C-terminal no caracterizada de p75.

A. Péptidos p40

La presente invención depende en parte de la observación de los inventores de fragmentos de la molécula p40 - los primeros 60 aminoácidos de la secuencia de p40 de longitud completa normal (SEQ ID NO:4), un fragmento que carece del líder, encontrado en los restos 29-60 de la SEQ ID NO:4 (SEQ ID NO:6). Los 28 restos NH₂-terminales de esta molécula, que comprenden una secuencia líder putativa, se cree que no son necesarios para la función.

Por tanto, los péptidos de la presente invención pueden comprender no más de 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 restos de la SEQ ID NO: 2, pero incluyendo al menos la SEQ ID NO:6, y opcionalmente incluyendo al menos la SEQ ID NO:4. Los péptidos pueden incluir opcionalmente otros segmentos no de p40.

Adicionalmente, péptidos con homología significativa a los péptidos de la presente invención muy probablemente ejercen efectos similares. Por lo tanto, se desvelan en el presente documento péptidos aislados de forma natural, recombinantes, o sintéticos con >80 %, >90 %, >95 %, >96 %, >97 %, >98 %, >99 % de similitud de secuencia con los péptidos de *Lactobacillus*.

Los segmentos p40 pueden estar unidos adicionalmente a otros segmentos peptídicos que confieren propiedades adicionales, tales como estabilización, direccionamiento celular. Además, los péptidos pueden comprender aminoácidos no naturales incluyendo D-aminoácidos y uno o más de los aminoácidos no naturales, analizados adicionalmente a continuación.

B. Purificación o enriquecimiento de proteínas y péptidos

En líneas generales, "purificado" se referirá a una composición de proteína específica que se ha sometido a fraccionamiento para retirar componentes no proteicos y otras diversas proteínas, polipéptidos, o péptidos, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad, que puede evaluarse, por ejemplo, por ensayos de proteínas, como se describe en el presente documento a continuación, o como sería conocido para un experto en la materia para la proteína, polipéptido o péptido deseado.

Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificado", esta se referirá a una composición en que la proteína, polipéptido o péptido específico forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente el 50 % de las proteínas en la composición o más. En realizaciones preferidas, una proteína sustancialmente purificada constituirá más del 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o incluso más de las proteínas en la composición.

Un péptido, polipéptido o proteína que está "purificada a homogeneidad", aplicado a la presente invención, significa que el péptido, polipéptido o proteína tiene un nivel de pureza donde el péptido, polipéptido o proteína está sustancialmente libre de otras proteínas y componentes biológicos. Por ejemplo, un péptido, polipéptido o proteína purificada a menudo estará suficientemente libre de otros componentes proteicos de modo que pueda realizarse de forma satisfactoria secuenciación degradante.

Serán conocidos para los expertos en la materia diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación de proteínas, polipéptidos o péptidos a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad proteica específica de una fracción, o evaluar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción por electroforesis en gel.

Para purificar una proteína, polipéptido o péptido deseado, una composición natural o recombinante que comprende al menos algunas proteínas, polipéptidos o péptidos específicos se someterá a fraccionamiento para retirar otros diversos componentes de la composición. Además de estas técnicas descritas en detalle a continuación en el presente documento, serán conocidas para los expertos en la materia otras diversas técnicas adecuadas para su uso en purificación de proteínas. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares o por desnaturalización térmica, seguida por centrifugación; etapas de cromatografía tales como intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxipatita, afinidad por lectina y otras etapas de cromatografía de afinidad; enfoque isoeléctrico; electroforesis en gel; y combinaciones de dichas y otras técnicas.

Otro ejemplo es la purificación de una proteína de fusión específica usando un compañero de unión específico. Dichos procedimientos de purificación son rutinarios en la técnica. Como la presente invención proporciona secuencias de ADN para las proteínas específicas, no puede ponerse en práctica ningún procedimiento de purificación de proteínas de fusión. Esto se ejemplifica mediante la generación de una proteína de fusión de proteína específica-glutación S transferasa, expresión en *E. coli*, y aislamiento a homogeneidad usando cromatografía de afinidad en glutatión-agarosa o la generación de una marca polihistidina en el extremo N o C terminal de la proteína, y posterior purificación usando cromatografía de afinidad por Ni. Sin embargo, dado que muchos ADN y proteínas son conocidos, o pueden identificarse y amplificarse usando los procedimientos descritos en el presente documento, ahora puede emplearse cualquier procedimiento de purificación.

Aunque se prefiriere para su uso en ciertas realizaciones, no existe la necesidad general de que la proteína, polipéptido o péptido siempre se proporcione en su estado más purificado. De hecho, se contempla que tenga utilidad una proteína, polipéptido o péptido sustancialmente menos purificado, que no obstante esté enriquecido en las composiciones proteicas deseadas, respecto al estado natural, en ciertas realizaciones.

Los procedimientos que muestran un grado inferior de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total de producto proteico, o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada. Los productos inactivos también tienen utilidad en ciertas realizaciones, tales como, por ejemplo, en la determinación de la antigenicidad mediante generación de anticuerpos.

En otras realizaciones, puede usarse una preparación enriquecida con los péptidos en lugar de una preparación purificada. En el presente documento, siempre que se use purificada, también puede usarse enriquecida. Una preparación puede no solamente estar enriquecida por procedimientos de purificación, sino también por la sobreexpresión o sobreproducción del péptido por bacterias en comparación con LGG de tipo silvestre. Esto puede conseguirse usando procedimiento recombinantes, o seleccionando condiciones que inducirán la expresión del péptido a partir de las células de tipo silvestre.

C. Preparaciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de péptido p40 disuelto o dispersado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administra a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según lo apropiado. La preparación de la composición farmacéutica que contiene un péptido p40 o ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado en el presente documento por referencia. Además, para administración a animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir normas de esterilidad, pirogenidad, seguridad general y pureza requeridas por la FDA Office of Biological Standards.

Como se usa en el presente documento "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, materiales similares y combinaciones de los mismos, que serían conocidos para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, pág. 1289-1329, incorporado en el presente documento por

referencia). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Los compuestos de la invención pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si tiene que administrarse en forma sólida, líquida o aerosol, o si tiene que ser estéril para vías de administración tales como inyección. La presente invención puede administrarse por vía oral, rectal, pero también puede administrarse por vía intratraqueal, intranasal, subcutánea, a la mucosa, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), por inyección, por infusión o infusión continua, de forma tópica, bañado por perfusión localizada de células diana directamente mediante un catéter, mediante un lavado, o por otro procedimiento o cualquier combinación de los anteriores que sería conocido para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado en el presente documento por referencia).

La cantidad real de dosificación de una composición de la presente invención administrada a un paciente puede determinarse por factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y la vía de administración. El facultativo responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingrediente o ingredientes activos en una composición y dosis apropiada o apropiadas para el sujeto individual.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse por conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, aunque sin limitación, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

Los compuestos de la presente invención pueden formularse en una composición en una base libre, forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales de adición de ácidos, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden también obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones en que la composición está en una forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, aunque sin limitación, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina; mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de dichos procedimientos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o combinaciones de los mismos.

En realizaciones particulares, las composiciones del péptido p40 de la presente invención se preparan para administración por vías tales como ingestión oral. En estas realizaciones la composición sólida puede comprender, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda), cápsula de liberación retardada, formulaciones de liberación sostenida, composiciones bucales, trociscos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, o combinaciones de los mismos. Las composiciones orales pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta. Los vehículos preferidos para administración oral comprenden diluyentes inertes, vehículos comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. En otros aspectos de la invención, la composición oral puede repararse como un jarabe o elixir. Un jarabe o elixir, y puede comprender, por ejemplo, al menos un agente activo, un agente edulcorante, un conservante, un agente aromatizante, un colorante, un conservante, o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones específicas, una composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes aromatizantes, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones una composición puede comprender uno o más de los siguientes: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, esterato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante tal como, por ejemplo, esterato de magnesio; un agente edulcorante tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente aromatizante tal como, por ejemplo, menta, aceite de gaulteria, aroma de cerezas, aroma de naranja, etc.; o combinaciones de los mismos anteriores. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener además de materiales del tipo anterior, vehículos tales como un vehículo líquido. Otros diversos materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, pueden recubrirse comprimidos, píldoras, o cápsulas con gomalaca, azúcar o ambos.

Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios. Los supositorios son formas sólidas de dosificación de diversos pesos y formas, habitualmente medicadas para introducción en el recto. Después de la introducción, los supositorios se ablandan, funden o disuelven en la cavidad. En general, para supositorios, los vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles, triglicéridos o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, los supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen, por ejemplo, el ingrediente activo en el intervalo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10%, y preferentemente de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 2 %.

Las soluciones inyectables estériles se reparan incorporando los compuestos activos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido por esterilización por filtración. En líneas generales, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsión, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de un medio líquido previamente filtrado a esterilidad del mismo. El medio líquido debe tamponarse adecuadamente si fuera necesario y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico antes de inyección con suficiente solución salina o glucosa. La preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa también se contempla, donde está previsto el uso de DMSO como disolvente para producir penetración extremadamente rápida, suministrando altas concentraciones de los agentes activos a un área pequeña.

La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación de endotoxinas debe mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, a menos de 0,5 ng/mg de proteína.

D. Productos alimenticios

Los péptidos de la presente invención pueden incorporarse de forma ventajosa a un alimento comestible directamente ingerible por un usuario, es decir, productos alimenticios, tales como suplementos nutritivos, bebidas saludables y alimentos probióticos. En líneas generales, los componentes de los diversos tipos de formulaciones alimenticias serán convencionales, aunque las cantidades precisas de los componentes individuales y la presencia de algunos de los componentes convencionales, puede no ser convencional en una formulación dada.

El producto alimenticio puede ser un producto cocinado. Puede incorporar carne o material derivado de animales (tales como carne de vacuno, pollo, pavo, cordero, pescado, plasma sanguíneo, hueso con tuétano, etc., o uno o más de los mismos). El producto como alternativa puede estar libre de carne (incluyendo preferentemente un sustituto de carne tal como soja, gluten de maíz o un producto de soja) para proporcionar una fuente de proteínas. El producto puede contener fuentes proteicas adicionales tales como concentrado de proteína de soja, leche, proteína, gluten, etc. El producto también puede contener una fuente de almidón tal como uno o más cereales (por ejemplo, trigo, maíz, arroz, avena, cebada, etc.) o puede estar libre de almidón. El producto puede incorporar o ser una matriz de almidón gelatinizado. El producto puede incorporar uno o más tipos de fibra tales como pulpa de remolacha azucarera, pulpa de achicoria, achicoria, fibra de endosperma de coco, fibra de trigo, etc. Pueden ser adecuados productos lácteos.

Para muchos alimentos, es práctica aceptada para el usuario añadir la cantidad necesaria de huevos en el curso de la preparación y esta práctica puede seguirse también en el presente documento. Si se desea, sin embargo, la inclusión de sólidos de huevo, en particular, albúmina de huevo y yema deshidratada, en el alimento son alternativas permitidas. También pueden usarse aislados de soja en el presente documento en lugar de albúmina de huevo.

Pueden añadirse agentes aromatizantes secos o líquidos a la formulación. Estos incluyen cacao, vainilla, chocolate, coco, menta, piña, cereza, nueces, especias, sales, potenciadores del aroma, entre otros.

Los acidulantes habitualmente añadidos a alimentos incluyen ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido acético, ácido fosfórico, y ácido clorhídrico.

Otros agentes pueden incluir antioxidantes, tampones del pH, agentes de enmascaramiento del sabor, agentes de enmascaramiento del olor, conservantes, mecanismos de liberación temporizada, vitaminas, minerales, electrolitos, hormonas, material a base de hierbas, agentes botánicos, aminoácidos, carbohidratos, grasas, o similares.

E. Producción de péptido

Los péptidos de la presente invención pueden producirse en una bacteria probiótica nativa, o una célula recombinante, tal como una bacteria, levadura, o célula de insecto. Los ejemplos proporcionados a continuación describen la purificación de p40 de longitud completa de bacterias probióticas nativas que producen estas proteínas como parte de su proteoma normal, y dichos procedimientos pueden aplicarse a la producción recombinante, de los péptidos analizados en el presente documento. En particular, puede cultivarse *Lactobacillus* GG en condiciones convencionales, como saben bien los expertos en la materia.

Se cultivó *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG (LGG) del siguiente modo. Se incubó LGG en caldo MRS de *Lactobacillus* a 37 °C durante 24 horas, después se diluyó en caldo MRS y se incubó a 37 °C hasta alcanzar fase log con densidad determinada por DO 0,5 a A600. Se precipitó LGG del caldo MRS (1000 x g, 15 min) y se lavó dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para tratar las células o preparar medio de cultivo celular condicionado por LGG.

Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Están disponibles en el mercado diversos sintetizadores automáticos y pueden usarse de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young, (1984); Tam y col., (1983); Merrifield, (1986); y Barany y Merrifield (1979), Houghten y col., (1985). En algunas realizaciones, se contempla la síntesis de péptidos usando máquinas automatizadas de síntesis de péptidos, tales como las disponibles en Applied Biosystems (Foster City, CA). Los péptidos de la presente invención pueden aislarse, y dializarse exhaustivamente para retirar moléculas indeseadas de pequeño peso molecular y/o liofilizarse para una formulación más fácil en un vehículo deseado.

En ciertas realizaciones, los péptidos p40 pueden expresarse de forma recombinante en células huésped heterólogas y posteriormente purificarse (por ejemplo, usando centrifugación y/o cromatografía). Como se analiza a continuación, se contempla una diversidad de composiciones y procedimientos para su uso en la producción recombinante de estas proteínas.

1. Vectores

El término "vector" se usa para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico vehículo en la cual puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para la introducción en una célula donde puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", que significa que es foránea a la célula en que tiene que introducirse el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en que no se encuentra habitualmente la secuencia. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales, y virus de plantas), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector a través de técnicas recombinantes convencionales (véase, por ejemplo, Maniatis y col., 1989 y Ausubel y col., 1994, ambos incorporados en el presente documento por referencia).

El término "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN después se traducen en una proteína, polipéptido, o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida de forma funcional en una célula huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que cumplen otras funciones también y se describen *infra*.

Los ácidos nucleicos que codifican péptidos p40 se exponen en las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9. Las secuencias pueden modificarse, dada la capacidad de varios codones diferentes de codificar un único aminoácido, codificando al mismo tiempo la misma proteína o polipéptido. También puede emprenderse optimización de selección de codones a la luz del organismo particular usado para expresión recombinante.

a. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en que está controlado el inicio y tasa de transcripción. Puede contener elementos genéticos en que pueden unirse proteínas reguladoras y moléculas, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las expresiones "posicionado de forma funcional", "unido de forma funcional", "bajo el control", y "bajo el control transcripcional" significan que un promotor está en una localización y/u orientación funcional correcta en relación a una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio de la transcripción y/o expresión de esa secuencia.

Un promotor generalmente comprende una secuencia que funciona posicionando el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El mejor ejemplo conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tales como, por ejemplo, el promotor para el gen de la desoxinucleotidiltransferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos de SV40, un elemento concreto superpuesto al propio sitio de inicio ayuda a fijar el sitio de inicio. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia del inicio de la transcripción. Típicamente, estos se localizan en la región 30-110 pb cadena arriba del sitio de inicio, aunque varios promotores han demostrado contener elementos funcionales cadena abajo del sitio de inicio también. Para llevar una secuencia codificante "bajo el control de" un promotor, se posiciona el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción de la fase de lectura transcripcional "cadena abajo" de (es decir, 3' de) el promotor elegido. El promotor "cadena arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

El espaciado entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de modo que se conserva la función del promotor cuando los elementos se invierten o mueven respecto unos de otros. En el promotor tk, el espaciado entre los elementos promotores puede aumentarse hasta 50 pb separados antes de que la actividad empiece a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción. Un promotor puede usarse o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción en cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, que puede obtenerse aislando las secuencias no codificantes 5' localizadas cadena arriba del segmento codificante y/o exón. Dicho promotor puede mencionarse como "endógeno" o "homólogo". Asimismo, un potenciador puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, localizado cadena abajo o cadena arriba de esa secuencia. Como alternativa, se obtendrán ciertas ventajas posicionando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante, exógeno o heterólogo, que se refiere a un promotor que no está asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo también se refiere a un potenciador no asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o potenciadores no "de origen natural", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, promotores que se usan muy habitualmente en construcción de ADN recombinante procariota incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa (penicilinas), lactosa y triptófano (trp).

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija de forma eficaz la expresión del segmento de ADN en el orgánulo, célula, tejido, órgano, u organismo elegido para la expresión. Los expertos en la materia de biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, potenciadores, y combinaciones de tipo celular para la expresión de proteínas, (véase, por ejemplo, Sambrook y col. 1989, incorporado en el presente documento por referencia). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles, y/o útiles en las condiciones apropiadas para dirigir una expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor poder ser heterólogo o endógeno.

Adicionalmente, también podría usarse cualquier combinación de promotor/potenciador (según, por ejemplo, la base de datos de promotores eucariotas EPDB, en el sitio web epd.isb-sib.ch/) para dirigir la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplasmático T3, T7 o SP6 es otra realización posible. Las células eucariotas puede soportar la transcripción citoplasmática a partir de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, como parte del complejo de suministro o como una construcción adicional de expresión genética.

b. Señales de inicio

También puede requerirse una señal específica de inicio para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen un codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede necesitarse proporcionar señales exógenas de control de la traducción, incluyendo el codón de inicio ATG. Un experto en la materia será fácilmente capaz de determinar esto y de proporcionar las señales necesarias. Es bien sabido que el codón de inicio debe estar "en fase" con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales exógenas de control de la traducción y codines de inicio pueden ser naturales o sintéticas. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.

c. Sitios de clonación múltiple

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de las cuales puede usarse junto con tecnología recombinante convencional para digerir el vector (véase, por ejemplo, Carbonelli y col., 1999, Levenson y col., 1998, y Cocea, 1997, incorporados en el presente documento por referencia). "Digestión con enzima de restricción" se refiere a escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solamente en localizaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles en el mercado. El uso de dichas enzimas es ampliamente comprendido por los expertos en la materia. Frecuentemente, un vector se linealiza o fragmenta usando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para posibilitar que se ligen secuencias exógenas al vector. "Ligamiento" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden ser contiguos o no entre sí. Las técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligamiento son bien conocidas para los expertos en la materia de tecnología recombinante.

d. Sitios de corte y empalme

La mayoría de las moléculas de ARN eucariotas transcritas experimentarán corte y empalme de ARN para retirar los intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucariotas genómicas pueden requerir sitios de corte y empalme donantes y/o aceptores para asegurar el apropiado procesamiento del transcrito para la expresión de la proteína (véase, por ejemplo, Chandler y col., 1997, incorporado en el presente documento por referencia).

e. Señales de terminación

Los vectores o construcciones de la presente invención generalmente comprenderán al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" está compuesta de las secuencia de ADN implicadas en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. Por tanto, en ciertas realizaciones, se contempla una señal de terminación que finaliza la producción de un transcrito de ARN. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para conseguir niveles deseables de mensaje.

Los terminadores contemplados para su uso en la invención incluyen cualquier terminador conocido de la transcripción descrito en el presente documento o conocido para un experto en la materia, incluyendo, aunque sin limitación, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes, tales como por ejemplo, el terminador de la hormona bovina de crecimiento o secuencias víricas de terminación, tales como, por ejemplo, el terminador de SV40. En ciertas realizaciones, la señal de terminación puede ser una ausencia de secuencia transcribible o traducible, tal como debido a un truncamiento de secuencia.

f. Señales de poliadenilación

En expresión, particularmente expresión eucariota, una típicamente incluirá una señal de poliadenilación para realizar la apropiada poliadenilación del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica satisfactoria de la invención, y puede emplearse cualquiera de estas secuencias. Las realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 o la señal de poliadenilación de la hormona bovina del crecimiento, conveniente y conocida por funcionar bien en diversas células dianas. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad del transcrito o puede facilitar el transporte citoplasmático.

g. Orígenes de replicación

Para propagar un vector en una célula huésped, puede contener uno o más sitios de origen de replicación (a menudo llamados "ori"), que es una secuencia específica de ácido nucleico en que se inicia la replicación. Como alternativa, puede emplearse una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula huésped es levadura.

h. Marcadores de selección y detección

En ciertas realizaciones de la invención, las células que contienen una construcción de ácido nucleico de la presente invención pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula permitiendo una fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. En líneas generales, un marcador de selección es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positiva es uno en que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador de selección negativa es uno en que su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador de selección positiva es un marcador de resistencia a fármaco.

Habitualmente, la inclusión de un marcador de selección de fármaco ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores útiles de selección. Además de marcadores que confieren un fenotipo que permita la discriminación de transformantes en base a la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores incluyendo marcadores de detección tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Como alternativa, pueden utilizarse enzimas de detección tales como la timidina quinasa (*tk*) o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) del virus del herpes simple. Un experto en la materia también conocería el modo de emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con análisis FACS. No se cree que el marcador usado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Ejemplos adicionales de marcadores de selección y detección son bien conocidos para los expertos en la materia.

i. Vectores plasmídicos

En ciertas realizaciones, se contempla un vector plasmídico para su uso para transformar una célula huésped. En general, los vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y control que se obtienen de especies compatibles con la célula huésped se usan junto con estos huéspedes. El vector habitualmente porta un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. En un ejemplo no limitante, a menudo se transforma *E. coli* usando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y

por tanto proporciona un medio fácil para identificar células transformadas. El plásmido pBR, u otro plásmido microbiano o fago también debe contener, o modificarse para contener, por ejemplo, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresión de sus propias proteínas.

Además, pueden usarse vectores fágicos que contienen secuencias de replicón y control que son compatibles con el microorganismo huésped como vectores transformantes en relación con estos huéspedes. Por ejemplo, puede utilizarse el fago lambda GEM™-11 en la preparación de un vector fágico recombinante que puede usarse para transformar células huésped, tales como, por ejemplo, *E. coli* LE392.

Vectores plasmídicos útiles adicionales incluyen vectores pIN (Inouye y col., 1985); y vectores pGEX, para su uso en la generación de proteínas de fusión solubles con glutatión S-transferasa (GST) para posterior purificación y separación o escisión. Otras proteínas de fusión adecuadas son aquellas con β -galactosidasa, ubiquitina, y similares.

Las células huésped bacterianas, por ejemplo *E. coli*, que comprenden el vector de expresión, se cultivan en cualquiera de varios medios adecuados, por ejemplo, LB. La expresión de la proteína recombinante en ciertos vectores puede inducirse, como entenderían los expertos en la materia, poniendo en contacto una célula huésped con un agente específico para ciertos promotores, por ejemplo, añadiendo IPTG al medio o cambiando la incubación a una temperatura mayor. Después de cultivar las bacterias durante un periodo adicional, generalmente de 2-24 horas, se recogen las células por centrifugación y se lavan para retirar el medio residual.

j. Vectores víricos

La capacidad de ciertos virus de infectar células y entrar en células mediante endocitosis mediada por receptor, y de integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar genes víricos de forma estable y eficaz los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos foráneos en células (por ejemplo, células de mamífero). Por tanto pueden utilizarse virus que codifican y expresan p40 y p75. Ejemplos no limitantes de vectores víricos que pueden usarse para suministrar un ácido nucleico p40 o p75 se describen a continuación.

Vectores adenovíricos. Un procedimiento particular para el suministro del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque se conocen vectores adenovíricos que tienen una baja capacidad para su integración en el ADN genómico, esta característica se contrarresta por la alta eficacia de transferencia génica producida por estos vectores. Se entiende que "vector de expresión de adenovirus" induce aquellas construcciones que contienen secuencias adenovíricas suficientes para (a) soportar el empaquetado de la construcción y (b) expresar finalmente una construcción específica de tejido o célula que se a clonado en el mismo. El conocimiento de la organización genética o adenovirus, un virus ADN bicatenario lineal de 36 kb, permite la sustitución de grandes trozos de ADN adenovírico con secuencias foráneas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992).

Vectores AAV. El ácido nucleico puede introducirse en la célula usando transfección asistida por adenovirus. Se ha informado de eficacias aumentadas de transfección en sistemas celulares usando sistemas acoplados a adenovirus (Kelleher y Vos, 1994; Cotten y col., 1992; Curiel, 1994). El virus adenoasociado (AAV) tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar células no en división, haciéndolo de este modo útil para suministro de genes en células de mamífero, por ejemplo, en cultivo tisular (Muzyczka, 1992) o *in vivo*. AAV tiene un amplio rango de huésped para infectividad (Tratschin y col., 1984; Laughlin y col., 1986; Lebkowski y col., 1988; McLaughlin y col., 1988). Se describen detalles respecto a la generación y uso de vectores rAAV en las patentes de Estados Unidos 5.139.941 y 4.797.368, cada una incorporada en el presente documento por referencia.

Vectores retrovíricos. Los retrovirus tienen la capacidad de integrar sus genes en el genoma huésped, transfiriendo una gran cantidad de material genético foráneo, infectando un amplio espectro de especies y tipos celulares y empaquetándose en líneas celulares especiales (Miller, 1992). Para construir un vector retrovírico, se inserta un ácido nucleico (por ejemplo, uno que codifica una proteína de interés) en el genoma vírico en el lugar de ciertas secuencias víricas para producir un virus que sea deficiente en replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol, y env pero sin los componentes LTR y de empaquetado (Mann y col., 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con las secuencias retrovíricas LTR y de empaquetado en una línea celular especial (por ejemplo, por precipitación con fosfato cálcico, por ejemplo), la secuencia de empaquetado permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas víricas, que después se secretan al medio de cultivo (Nicolas y Rubinstein, 1988; Temin, 1986; Mann y col., 1983). El medio que contiene los retrovirus recombinantes después se recoge, se concentra opcionalmente, y se usa para transferencia génica. Los vectores retrovíricos son capaces de infectar una amplia diversidad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y expresión estable requieren la división de células huésped (Paskind y col., 1975).

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovíricos comunes gag, pol, y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivíricos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naldini y col., 1996; Zufferey y col., 1997; Blomer y col., 1997; patentes de Estados Unidos 6.013.516 y 5.994.136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de la inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia del simio: VIS. Los vectores lentivíricos se han generado atenuando de forma múltiple los

genes de virulencia de VIH, por ejemplo, los genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* se deletan haciendo que el vector sea biológicamente seguro.

Los vectores lentivíricos recombinantes son capaces de infectar células no en división y pueden usarse para transferencia génica tanto *in vivo* como *ex vivo* y expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, se describe lentivirus recombinante capaz de infectar una célula no en división donde se transfecta una célula huésped adecuada con dos o más vectores que portan las funciones de empaquetado, concretamente gag, pol y env, así como rev y tat en la patente de Estados Unidos 5.994.136, incorporada en el presente documento por referencia. Uno puede dirigir el virus recombinante por unión de la proteína de envuelta con un anticuerpo o un ligando particular para dirigirlo a un receptor de un tipo celular particular. Insertando una secuencia (incluyendo una región reguladora) de interés en el vector vírico, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector ahora es específico de diana.

Otros vectores víricos. Pueden emplearse otros vectores víricos como construcciones de vacuna en la presente invención. Pueden emplearse vectores derivados de virus tales como virus vaccinia (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988), virus sindbis, citomegalovirus y virus del herpes simple. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988; Horwich y col., 1990).

Virus modificados. Un ácido nucleico a suministrarse puede alojarse dentro de un virus infeccioso que se ha modificado por ingeniería para que exprese un ligando específico de unión. La partícula vírica por tanto se unirá específicamente a los receptores afines de la célula diana y suministrará los contenidos a la célula. Un nuevo enfoque diseñado para permitir el direccionamiento específico de vectores retrovíricos se desarrolló en base a la modificación química de un retrovirus por la adición química de restos de lactosa a la envuelta vírica. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos mediante receptores de sialoglucoproteína.

Se diseñó otro enfoque para dirigir retrovirus recombinantes en que se usaban anticuerpos biotinilados contra una proteína de envuelta retrovírica y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux y col., 1989). Usando anticuerpos contra antígenos del complejo principal de histocompatibilidad clase I y clase II, demostraron la infección de una diversidad de células humanas que albergan esos antígenos superficiales con un virus ectópico *in vitro* (Roux y col., 1989).

2. Suministro del vector y transformación de células

Se cree que los procedimientos adecuados para suministro de ácido nucleico para transformación de un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo para su uso con la presente invención incluyen casi cualquier procedimiento por el cual pueda introducirse un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como conocería un experto en la materia. Dichos procedimientos incluyen, aunque sin limitación, suministro directo de ADN tal como por transfección *ex vivo* (Wilson y col., 1989; Nabel y col., 1989), por inyección (patentes de Estados Unidos 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859, cada una incorporada en el presente documento por referencia), incluyendo microinyección (Harland y Weintraub, 1985; patente de Estados Unidos 5.789.215, incorporada en el presente documento por referencia); por electroporación (patente de Estados Unidos 5.384.253, incorporada en el presente documento por referencia; Tur-Kaspa y col., 1986; Potter y col., 1984); por precipitación con fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); usando DEAE-dextrano seguido por polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988); por bombardeo con microproyectiles (solicitudes PCT N.º WO 94/09699 y 95/06128; patentes de Estados Unidos 5.610.042; 5.322.783 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880, y cada una incorporada en el presente documento por referencia); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppler y col., 1990; patentes de Estados Unidos 5.302.523 y 5.464.765, cada una incorporada en el presente documento por referencia); por transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de Estados Unidos 5.591.616 y 5.563.055, cada una incorporada en el presente documento por referencia); por transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirulheh y col., 1993; patentes de Estados Unidos 4.684.611 y 4.952.500, cada una incorporada en el presente documento por referencia); por captación de ADN mediada desecación/inhibición (Potrykus y col., 1985), y cualquier combinación de dichos procedimientos. A través de la aplicación de técnicas tales como estas, puede transformarse de forma estable o transitoria uno o más orgánulos, células, tejido u organismos.

a. Transformación *ex vivo*

Los expertos en la materia conocen procedimientos para transfectar células y tejidos vasculares retirados de un organismo en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, se han alterado genéticamente células endoteliales caninas por transferencia génica retrovírica *in vitro* y se han trasplantado en un canino (Wilson y col., 1989). En otro ejemplo, se transfectaron células endoteliales de cerdo enano de Yucatán por retrovirus *in vitro* y se trasplantaron en una arteria usando un catéter de doble globo (Nabel y col., 1989). Por tanto, se contempla que pueden retirarse células o tejidos y transfectarse *ex vivo* usándolo los ácidos nucleicos de la presente invención. En aspectos particulares, las células

o tejidos trasplantados pueden colocarse en un organismo. En facetas preferidas, se expresa un ácido nucleico en las células o tejidos trasplantados.

b. Inyección

5 En ciertas realizaciones, puede suministrarse un ácido nucleico a un orgánulo, a una célula, un tejido, o un organismo mediante una o más inyecciones (es decir, una inyección con aguja) tal como, por ejemplo, de forma subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc. Los procedimientos de inyección de vacunas son bien conocidos para los expertos en la materia (por ejemplo, inyección de una composición que comprende una solución salina). Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen la introducción de un ácido nucleico por microinyección directa. La microinyección directa se ha usado para introducir construcciones de ácido nucleico en
10 ovocitos de *Xenopus* (Harland y Weintraub, 1985). La cantidad de vector usada puede variar según la naturaleza del antígeno así como el orgánulo, célula, tejido u organismo usado.

c. Electroporación

15 En ciertas realizaciones de la presente invención, se introduce un ácido nucleico en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo mediante electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y ADN a una descarga eléctrica de alto voltaje. En algunas variantes de este procedimiento, ciertas enzimas degradantes de la pared celular, tales como enzimas degradantes de pectina, se emplean para volver a las células receptoras dianas más susceptibles a transformación por electroporación que las células no tratadas (patente de Estados Unidos 5.384.253, incorporada en el presente documento por referencia). Como alternativa, las células receptoras pueden hacerse más susceptibles a transformación por herida mecánica.

20 La transfección de células eucariotas usando electroporación ha sido bastante satisfactoria. Se han transfectado linfocitos pre-B de ratón con genes de inmunoglobulina kappa humana (Potter y col., 1984), y se han transfectado hepatocitos de rata con el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (Tur-Kaspa y col., 1986) de este modo.

25 Para lograr la transformación por electroporación en células tales como, por ejemplo, células vegetales, se pueden emplear tejidos desmenuzables, tales como un cultivo en suspensión de células o callo embriogénico o como alternativa se pueden transformar embriones inmaduros u otro tejido organizado directamente. En esta técnica, se degradarían parcialmente las paredes celulares de las células elegidas exponiéndolas a enzimas degradantes de pectina (pectoliasas) o por herida mecánica de un modo controlado. Ejemplos de algunas especies que se han transformado por electroporación de células intactas incluyen maíz (patente de Estados Unidos 5.384.253; Rhodes y col., 1995; D'Halluin y col., 1992), trigo (Zhou y col., 1993), tomate (Hou y Lin, 1996), soja (Christou y col., 1987) y
30 tabaco (Lee y col., 1989).

También se pueden emplear protoplastos para transformación por electroporación de células vegetales (Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Por ejemplo, se describe la generación de plantas de soja transgénicas por electroporación de protoplastos derivados de cotiledones por Dhir y Widholm en la solicitud de patente internacional n.º WO 9217598, incorporada en el presente documento por referencia. Otros ejemplos de especies para las que se ha descrito la
35 transformación con protoplastos incluyen cebada (Lazzeri, 1995), sorgo (Battraw y col., 1991), maíz (Bhattacharjee y col., 1997), trigo (He y col., 1994) y tomate (Tsukada, 1989).

d. Fosfato cálcico

40 En otras realizaciones de la presente invención, se introduce un ácido nucleico a las células usando precipitación con fosfato cálcico. Se han transfectado células KB humanas con ADN de adenovirus 5 (Graham y Van Der Eb, 1973) usando esta técnica. También de este modo, se han transfectado células de ratón L(A9), ratón C127, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y HeLa con un gen marcador de neomicina (Chen y Okayama, 1987), y se transfectaron hepatocitos de rata con una diversidad de genes marcadores (Rippe y col., 1990).

e. DEAE-dextrano

45 En otra realización, se suministra un ácido nucleico en una célula usando DEAE-dextrano seguido por polietilenglicol. De este modo, se introdujeron plásmidos indicadores en células de mieloma y eritroleucemia de ratón (Gopal, 1985).

f. Carga por sonicación

50 Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen la introducción de ácido nucleico por carga sónica directa. Se han transfectado fibroblastos LTK⁻ con el gen de la timidinaquinasa por carga por sonicación (Fechheimer y col., 1987).

g. Transfección mediada por liposoma

En una realización adicional de la invención, puede atraparse un ácido nucleico en un complejo lipídico tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por

medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan autoordenación antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contempla un ácido nucleico en complejo con Lipofectamine (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen).

- 5 El suministro de ácido nucleico mediado por liposoma y la expresión de ADN foráneo *in vitro* ha sido muy satisfactorio (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987). También se ha demostrado la factibilidad del suministro mediado por liposoma y la expresión de ADN foráneo en embrión cultivado de pollo, células HeLa y de hepatoma (Wong y col., 1980).

- 10 En ciertas realizaciones de la invención, un liposoma puede ponerse en complejo con un virus hemaglutinante (HVJ). Esto ha demostrado facilitar la fusión con la membrana celular y promover la entrada en la célula del ADN encapsulado en el liposoma (Kaneda y col., 1989). En otras realizaciones, un liposoma puede ponerse en complejo o emplearse junto con proteínas cromosómicas nucleares no histona (HMG-1) (Kato y col., 1991). Entre más realizaciones adicionales, un liposoma puede ponerse en complejo o emplearse junto con HVJ y HMG-1. En otras realizaciones, un vehículo de suministro puede comprender un ligando y un liposoma.

15 **h. Transfección mediana por receptor**

Adicionalmente, un ácido nucleico puede suministrarse a una célula diana mediante vehículos de suministro mediado por receptor. Estos aprovechan la captación selectiva de macromoléculas por endocitos y mediada por receptor que sucederá en una célula diana. En vista de la distribución específica de tipo celular de diversos receptores, este procedimiento de suministro añade otro grado de especificidad a la presente invención.

- 20 Ciertos vehículos de direccionamiento génico mediado por receptor comprenden un ligando específico de receptor celular y un agente de unión a ácido nucleico. Otros comprenden un ligando específico de receptor celular al cual se ha unido el ácido nucleico a suministrar. Se han usado varios ligandos para transferencia génica mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wagner y col., 1990; Perales y col., 1994; Myers, documento EPO 0273085), que establece la operatividad de la técnica. Se ha descrito el suministro específico en el contexto de otro tipo celular de mamífero (Wu y Wu, 1993; incorporado en el presente documento por referencia). En ciertos aspectos de la presente invención, se elegirá un ligando para que corresponda con un receptor expresado específicamente en la población de células diana.

- 30 En otras realizaciones, un componente del vehículo de suministro de ácido nucleico de un vehículo de direccionamiento de ácido nucleico específico de célula puede comprender un ligando de unión específica en combinación con un liposoma. El ácido o ácidos nucleicos a suministrar se alojan dentro del liposoma y el ligando de unión específica se incorpora de forma funcional a la membrana del liposoma. El liposoma por tanto se unirá específicamente al receptor o receptores de una célula diana y suministrará los contenidos a una célula. Dichos sistemas han demostrado ser funcionales usando sistema en que, por ejemplo, se usa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el suministro mediado por receptor de un ácido nucleico a células que muestran regulación positiva del receptor de EGF.

- 35 En más realizaciones adicionales, el componente del vehículo de suministro de ácido nucleico de un vehículo de suministro dirigido puede ser un liposoma en sí mismo, que preferentemente comprenderá uno o más lípidos o glucoproteínas que dirigen la unión específica de célula. Por ejemplo, se ha incorporado lactosilceramida, un asialgangliósido de galactosa terminal, en liposomas y se ha observado un aumento en la captación del gen de insulina por hepatocitos (Nicolau y col., 1987). Se contempla que las construcciones transformantes específicas de tejido de la presente invención pueden suministrarse específicamente a una célula diana de un modo similar.

1. Bombardeo de microproyectiles

- 45 Pueden usarse técnicas de bombardeo de microproyectiles para introducir un ácido nucleico en al menos un orgánulo, célula, tejido u organismo (patente de Estados Unidos 5.550.318; patente de Estados Unidos 5.538.880; patente de Estados Unidos 5.610.042; y solicitud PCT WO 94/09699; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia). Este procedimiento depende de la capacidad de acelerar microproyectiles recubiertos con ADN a una alta velocidad permitiéndoles perforar las membranas celulares y entrar en las células sin eliminarlas (Klein y col., 1987). Existe una amplia diversidad de técnicas de bombardeo de microproyectiles conocidas en la técnica, muchas de las cuales son aplicables a la invención.

- 50 En este bombardeo de microproyectiles, una o más partículas pueden recubrirse con al menos un ácido nucleico y suministrarse a células mediante una fuerza de propulsión. Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de dichos dispositivos depende de una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang y col., 1990). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como partículas o perla de tungsteno u oro. Partículas ejemplares incluyen aquellas compuestas por tungsteno, platino, y preferentemente oro. Se contempla que en algunos casos no sería necesaria la precipitación de ADN en partículas metálicas para el suministro de ADN a una célula receptora usando bombardeo de microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas pueden contener ADN en lugar de estar recubiertas con ADN. Las partículas recubiertas con ADN pueden aumentar el nivel de suministro de

ADN mediante bombardeo de partículas pero no son necesarias en sí mismas y por sí mismas.

Una realización ilustrativa de un procedimiento para suministrar ADN a una célula por aceleración es el sistema de suministro de partículas por biolística, que puede usarse para impulsar partículas recubiertas con ADN o células a través de un tamiz, tal como un tamiz de acero inoxidable o Nytex, en una superficie de filtro cubierta con células, tal como por ejemplo, células de plantas monocotiledonias cultivadas en suspensión. El tamiz dispersa las partículas de modo que no se suministran a las células receptoras en grandes agregados. Se cree que un tamiz intermedio entre el aparato de proyectiles y las células a bombardear, reduce el tamaño de agregado de proyectiles y puede contribuir a una mayor frecuencia de transformación reduciendo el daño infligido sobre las células receptoras por proyectiles que son demasiado grandes.

3. Células huésped

Como se usa en el presente documento, los términos "células", "línea celular", y "cultivo celular" pueden usarse de forma intercambiable. Todos estos términos también incluyen su descendencia, que es todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o accidentales. En el contexto de la expresión de una secuencia heteróloga de ácido nucleico, "célula huésped" se refiere a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula huésped puede usarse, y se ha usado, como receptor para vectores. Una célula huésped puede "transfectarse" o "transformarse", que se refiere a un proceso por el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno a la célula huésped. Una célula transformada incluye la célula objeto principal y su descendencia. Como se usa en el presente documento, los términos células o células huésped "modificadas por ingeniería" o "recombinantes" pretenden hacer referencia a una célula en que se ha introducido una secuencia exógena de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, un vector. Por lo tanto, las células recombinantes son distinguibles de células de origen natural que no contienen un ácido nucleico introducido de forma recombinante.

En ciertas realizaciones, se contempla que pueden coexpresarse ARN o secuencias proteicas con otros ARN o secuencias proteicas seleccionadas en la misma célula huésped. La coexpresión puede conseguirse por cotransfección de la célula huésped con dos o más vectores recombinantes distintos. Como alternativa, puede construirse un único vector recombinante para incluir múltiples regiones codificantes distintas para ARN, que después podrían expresarse en las células huésped transfectadas con el único vector.

En ciertas realizaciones, la célula o tejido huésped puede estar comprendido en al menos un organismo. En ciertas realizaciones, el organismo puede ser aunque sin limitación, un procariota (por ejemplo, una eubacteria, una arqueobacteria) o un eucariota (levadura), como entendería un experto en la materia (véase, por ejemplo, la página web phylogeny.arizona.edu/tree/phy-logeny.html).

Están disponibles numerosas líneas celulares y cultivos para su uso como célula huésped, y pueden obtenerse a través de la American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como archivo para cultivos vivos y materiales genéticos (sitio web en atcc.org). Un huésped apropiado puede determinarse por un experto en la materia en base a la estructura del vector y el resultado deseado. Puede introducirse un plásmido o cósmido, por ejemplo, en una célula huésped procariota para replicación de muchos vectores. Los tipos celulares disponibles para replicación y/o expresión del vector incluyen, aunque sin limitación, bacterias, tales como *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* cepa RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC n.º 31537) así como *E. coli* W3110 (F-, lambda-, prototrófica, ATCC n.º 273325), DH5α, JM109, y KC8, bacilos tales como *Bacillus subtilis*; y otras enterobacteriaceae tales como *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, diversas especies de *Pseudomonas* así como varios huéspedes bacterianos disponibles en el mercado tales como células competentes SURE® y células SOLOPACK™ Gold (STRATAGENE®, La Jolla). En ciertas realizaciones se contemplan particularmente células bacterianas tales como *E. coli* LE392 como células huésped para virus fágicos.

Ejemplos de células huésped eucariotas para replicación y/o expresión de un vector incluyen, aunque sin limitación, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos, y PC12. Muchas células huésped de diversos tipos celulares y organismos están disponibles y serían conocidas para los expertos en la materia. Asimismo, puede usarse un vector vírico junto con una célula huésped eucariota o procariota, particularmente una que sea permisiva para replicación o expresión del vector.

Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que les permitirán replicarse y/o expresarse en células tanto procariotas como en células eucariotas. Un experto en la materia entendería adicionalmente las condiciones en las cuales incubar todas las células huésped descritas anteriormente para mantenerlas y permitir la replicación de un vector. También se entiende y se conocen técnicas y condiciones que permitirían producción a gran escala de vectores, así como la producción de los ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos, proteínas, o péptidos afines.

4. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos una parte o todo de las composiciones analizadas anteriormente. Pueden emplearse sistemas basados en procariotas y/o eucariotas para su uso con la

presente invención para producir secuencias de ácido nucleico, o sus polipéptidos, proteínas o péptidos afines. Muchos de estos sistemas están disponibles en el mercado y ampliamente.

El sistema de célula de insecto/baculovirus puede producir un alto nivel de expresión proteica de un segmento heterólogo de ácido nucleico, tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.871.986 y 4.879.236, ambas incorporadas en el presente documento por referencia, y que pueden comprarse, por ejemplo, con el nombre MAVBAC® 2.0 de INVITROGEN® y BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM de CLONTECH®.

Otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen el sistema de expresión de mamífero inducible COMPLETE CONTROL™ de STRATAGENE®, que implica un receptor inducible por ecdisona, y su sistema de expresión pET, un sistema de expresión de *E.coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible en INVITROGEN®, que porta el sistema T-REX™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión de mamífero inducible que usa el promotor CMV de longitud completa. INVITROGEN® también proporciona un sistema de expresión de levadura llamado el Sistema de Expresión *Pichia methanolica*, que está diseñado para producción a alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Un experto en la materia conocería el modo de expresar un vector, tal como una construcción de expresión, para producir una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína o péptido afín.

Se contempla que las proteínas, polipéptidos o péptidos producidos por los procedimientos de la invención pueden "sobreexpresarse", es decir, expresarse en niveles aumentados respecto a su expresión natural en células. Dichas sobreexpresión puede evaluarse por una diversidad de procedimientos, incluyendo radiomarcage y/o purificación de proteínas. Sin embargo, se prefieren procedimientos simples y directos, por ejemplo, los que implican SDS/PAGE y tinción de proteínas o transferencia de Western, seguido por análisis cuantitativos, tales como escaneo densitométrico del gel o transferencia resultante. Un aumento específico en el nivel de la proteína, polipéptido o péptido recombinante en comparación con el nivel en células naturales es indicativo de sobreexpresión, ya que es una abundancia relativa de la proteína, polipéptidos o péptidos específicos en relación a las otras proteínas producidas por la célula huésped y, por ejemplo, visible en un gel.

En algunas realizaciones, la secuencia proteica expresada forma un cuerpo de inclusión en la célula huésped, las células huésped se lisan, por ejemplo, por alteración en un homogeneizador celular, se lavan y/o centrifugan para separar los cuerpos de inclusión densos y las membranas celulares de los componentes celulares solubles. Esta centrifugación puede realizarse en condiciones mediante las cuales los cuerpos de inclusión densos se enriquecen selectivamente por incorporación de azúcares, tales como sacarosa, en el tampón y centrifugación a una velocidad selectiva. Los cuerpos de inclusión pueden solubilizarse en soluciones que contienen altas concentraciones de urea (por ejemplo, 8 M) o agentes caotrópicos tales como clorhidrato de guanidina en presencia de agentes reductores, tales como β -mercaptoetanol o DTT (ditiotretol), y replegarse en una conformación más deseable, como conocerían los expertos en la materia.

F. Variantes proteicas

Como se ha mencionado anteriormente, pueden hacerse modificaciones y/o cambios en la estructura del péptido p40-60 AA, y por tanto la presente invención contempla variación en secuencia de este péptido, y ácidos nucleicos que la codifican, donde no obstante son capaces de retener actividad sustancial con respecto a los aspectos preventivos y curativos de la presente invención.

1. Polinucleótidos y polipéptidos modificados

El equivalente funcional biológico puede comprender un polinucleótido que se ha modificado por ingeniería para que contenga distintas secuencias reteniendo al mismo tiempo la capacidad de codificar el péptido "de tipo silvestre" o normal. Esto puede conseguirse con la degeneración del código genético, es decir, la presencia de múltiples codones, que codifican los mismos aminoácidos. En un ejemplo, un experto en la materia puede desear introducir una secuencia de reconocimiento por enzima de restricción en un polinucleótido sin alterar la capacidad de ese polinucleótido de codificar una proteína.

En otro ejemplo, un polinucleótido puede ser (y codificar) un equivalente funcional biológico con cambios más significativos. Ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos, sitios de unión en moléculas de sustrato, receptores, y similares. Los llamados cambios "conservativos" no alteran la actividad biológica de la proteína, ya que el cambio estructural no es uno que afecte a la capacidad proteica de realizar su función designada. Por tanto, se contempla por los inventores que pueden hacerse diversos cambios en la secuencia de genes y proteínas desvelados en el presente documento, cumpliendo aún al mismo tiempo los objetivos de la presente invención.

En términos de equivalentes funcionales, los expertos en la materia entienden bien que, inherente en la definición de una proteína y/o polinucleótido "equivalente biológicamente funcional", es el concepto de que existe un límite a la cantidad de cambios que pueden hacerse dentro de una parte definida de la molécula reteniendo al mismo tiempo una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Los equivalentes biológicamente funcionales por tanto se definen en el presente documento como aquellas proteínas (y polinucleótidos) en que pueden sustituirse

aminoácidos seleccionados (o codones).

En general, cuanto más corta es la longitud de la molécula, menos cambios pueden hacerse dentro de la molécula reteniendo la función. Dominios más largos pueden tener una cantidad intermedia de cambios. La proteína de longitud completa tendrá la mayor tolerancia para una cantidad mayor de cambios. Sin embargo, debe apreciarse que ciertas moléculas o dominios que son altamente dependientes de su estructura pueden tolerar poca o ninguna modificación.

Las sustituciones de aminoácido generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y/o similares. Un análisis del tamaño, forma y/o tipo de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácido revela que la arginina, lisina y/o histidina son todos restos cargados positivamente; que la alanina, glicina y/o serina son todos de un tamaño similar; y/o que la fenilalanina, triptófano y/o tirosina tienen todos una forma generalmente similar. Por lo tanto, en base a estas consideraciones, la arginina, lisina y/o histidina; la alanina, glicina y/o serina; y/o fenilalanina, triptófano y/o tirosina; se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales.

Para lograr cambios más cuantitativos, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. Cada aminoácido tiene asignado un índice hidropático en base a su hidrofobicidad y/o características de carga, estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y/o arginina (-4,5).

La importancia del índice hidropático del aminoácido a la hora de conferir función biológica interactiva en una proteína está generalmente comprendida en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982, incorporado en el presente documento por referencia). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice y/o valor hidropático similar y/o retienen aún una actividad biológica similar. Al hacer cambios en base al índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , aquellos que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y/o aquellos dentro de $\pm 0,5$ son incluso más particularmente preferidos.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse de forma eficaz en base a la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína y/o péptido equivalente funcional biológico de ese modo creado tiene un uso pretendido en realizaciones inmunológicas, como en ciertas realizaciones de la presente invención. La patente de Estados Unidos 4.554.101, incorporada en el presente documento por referencia, establece que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, regida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y/o antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a restos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). En la realización de cambios en base a valores similares de hidrofiliidad, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , aquellos que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y/o aquellos dentro de $\pm 0,5$ son incluso más particularmente preferidos.

2. Aminoácidos alterados

La presente invención, en muchos aspectos, depende de la síntesis de péptidos y polipéptidos *in cito*, mediante transcripción y traducción de polinucleótidos apropiados. Estos péptidos y polipéptidos incluirán los veinte aminoácidos "naturales", y modificaciones post-traduccionales de los mismos. Sin embargo, la síntesis *in vitro* de péptidos permite el uso de aminoácidos modificados y/o inusuales. Se proporciona a continuación en el presente documento una tabla de aminoácidos modificados y/o inusuales ejemplares, pero no limitantes.

Tabla 1 - Aminoácidos modificados y/o inusuales

<u>Abr.</u>	<u>Aminoácido</u>	<u>Abr.</u>	<u>Aminoácido</u>
Aad	2-Ácido aminoadípico	EtAsn	N-Etilasparagina
BAad	3- Ácido aminoadípico	Hyl	Hidroxilisina
BAla	beta-alanina, ácido beta-Amino-propiónico	AHyl	alo-Hidroxilisina
Abu	2- Ácido aminobutírico	3Hyp	3-Hidroxiprolina
4Abu	4- Ácido aminobutírico, ácido piperidínico	4Hyp	4-Hidroxiprolina
Acp	6- Ácido aminocaproico	Ide	Isodesmosina

(continuación)

Tabla 1 - Aminoácidos modificados y/o inusuales			
<u>Abr.</u>	<u>Aminoácido</u>	<u>Abr.</u>	<u>Aminoácido</u>
Ahe	2- Ácido aminoheptanoico	Aile	alo-Isoleucina
Aib	2- Ácido aminoisobutírico	MeGly	N-Metilglicina, sarcosina
BAib	3- Ácido aminoisobutírico	Melle	N-Metilisoleucina
Apm	2- Ácido aminopimélico	MeLys	6-N-Metil-lisina
Dbu	2,4- Ácido diaminobutírico	MeVal	N-Metilvalina
Des	Desmosina	Nva	Norvalina
Dpm	2,2'- Ácido diaminopimélico	Nle	Norleucina
Dpr	2,3- Ácido diaminopropiónico	Orn	Ornitina
EtGly	N-Etilglicina		

3. Miméticos

Además de los equivalentes funcionales biológicos analizados anteriormente, los presentes inventores también contemplan que pueden formularse compuestos estructuralmente similares para imitar las partes clave de los péptidos p40 de la presente invención. Dichos compuestos, que pueden llamarse peptidomiméticos, pueden usarse del mismo modo que los péptidos de la invención y, por tanto, también son equivalentes funcionales.

Ciertos miméticos que imitan elementos de estructura secundaria y terciaria de la proteína se describen en Johnson y col. (1993). El fundamento subyacente detrás del uso de los peptidomiméticos es que la estructura peptídica de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de los aminoácidos de tal modo que se faciliten las interacciones moleculares, tales como las de un anticuerpo y/o antígeno. Un peptidomimético por tanto se diseña para permitir interacciones moleculares similares a la molécula natural.

Algunas aplicaciones satisfactorias del concepto de peptidomiméticos se han centrado en miméticos de giros- β dentro de las proteínas, que se sabe que son altamente antigénicos. Asimismo, puede predecirse una estructura de giro- β dentro de un polipéptido por algoritmos basados en ordenador, como se analiza en el presente documento. Una vez determinados los aminoácidos componentes del giro, pueden construirse miméticos para conseguir una orientación espacial similar de los elementos esenciales de las cadenas laterales de aminoácido.

Otros enfoques se han centrado en el uso de proteínas pequeñas que contienen multi-disulfuro como moldes estructurales atractivos para producir conformaciones biológicamente activas que imiten los sitios de unión de proteínas grandes (Vita y col., 1998). Un motivo estructural que parece estar evolutivamente conservado en ciertas toxinas es pequeño (30-40 aminoácidos), estable, y altamente permisivo para mutación. Este motivo está compuesto de una lámina beta y una hélice alfa unida por puente en el núcleo interior por tres disulfuros.

Los giros beta II se han imitado satisfactoriamente usando L-pentapéptidos cíclicos y aquellos con D-aminoácidos (Weisshoff y col., 1999). Además, Johannesson y col. (1999) informan de tripéptidos bicíclicos con propiedades que inducen giro inverso.

Se han desvelado en la técnica procedimientos para generar estructuras específicas. Por ejemplo, se desvelan miméticos de hélice alfa en las patentes de Estados Unidos 5.446.128, 5.710.245, 5.840.833 y 5.859.184. Estas estructuras vuelven al péptido o proteína más estable térmicamente, también aumentan la resistencia a degradación proteolítica. Se desvelan estructuras de anillo de seis, siete, once, doce, trece y catorce miembros.

Se describen procedimientos para generar giros beta conformacionalmente restringidos y protuberancias beta, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 5.440.013, 5.618.914 y 5.670.155. Los giros beta permiten sustituyentes laterales cambiados sin tener cambios en la correspondiente conformación de la estructura, y tienen extremos apropiados para su incorporación en péptidos por procedimientos de síntesis convencional. Otros tipos de giros miméticos incluyen giros inversos y gamma. Se desvelan miméticos de giro inverso en las patentes de Estados Unidos 5.475.085 y 5.929.237, y se describen miméticos de giros gamma en las patentes de Estados Unidos 5.672.681 y 5.674.976.

II. Trastorno de células epiteliales (TCE)

La aplicación clínica eficaz de probióticos se ha limitado por la biodisponibilidad y bioseguridad de la manipulación de la flora bacteriana en el tracto gastrointestinal. Un enfoque innovador es a través del desarrollo de proteínas derivadas de bacterias probióticas como reactivos terapéuticos. Los inventores han purificado previamente y clonado una proteína secretada por *Lactobacillus rhamnosus* GG, p40, que protege el epitelio intestinal del daño tisular inducido por DSS y colitis de un modo dependiente del receptor (R) de EGF. Este trabajo aquí ha identificado composiciones peptídicas de 180, 60, y 32 aminoácidos de longitud, que pueden usarse para prevenir o tratar un trastorno que implica apoptosis patológica de células epiteliales. En una realización, se causa apoptosis de células epiteliales o se mantiene por citoquinas.

En ciertas realizaciones, el TCE prevenido o tratado por la presente invención puede ser una enfermedad inflamatoria del intestino tal como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. Sin embargo, la expresión "enfermedad inflamatoria del intestino" o "EII", como se usan en el presente documento, describen una amplia clase de enfermedades caracterizadas por inflamación de al menos parte del tracto gastrointestinal. Los síntomas de EII pueden incluir inflamación del intestino y provocar calambres abdominales y diarrea persistente. Las enfermedades inflamatorias del intestino incluyen colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC), colitis indeterminada, colitis crónica, enfermedad discontinua o desigual, pouchitis, proctitis, inflamación ileal, inflamación extracolónica, inflamación granulomatosa en respuesta a criptas rotas, úlceras aftosas, inflamación transmural, colitis microscópica, diverticulitis y colitis por desvío. Los péptidos de la presente invención también pueden ser particularmente útiles para promover una función intestinal sana de bebés o neonatos prematuros/poco desarrollados, y afecciones que afectan a estos pacientes tales como enterocolitis necrotizante. Las aplicaciones también pueden incluir mantenimiento de un estado intestinal sano antes de la aparición de un TCE o durante la recuperación de una intervención por TCE, por ejemplo, remisión inducida farmacológica o quirúrgicamente de una enfermedad o afección. Aplicaciones adicionales también pueden incluir infecciones gastrointestinales, tales como las causadas por cólera, rotavirus o *E. coli* enterotoxigénica. Pueden incluir adicionalmente otras afecciones tales como síndrome del intestino irritable (SII) u otras afecciones o malestares asociados con apoptosis de células epiteliales, integridad comprometida de la barrera, o intestino o función de las células epiteliales alterada de otro modo.

A. Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa es una enfermedad que causa inflamación y llagas, llamadas úlceras, en el revestimiento del intestino grueso. La inflamación habitualmente sucede en el recto y la parte inferior del colon, pero puede afectar al colon completo. La colitis ulcerosa raramente afecta al intestino delgado excepto por la sección final, llamada el íleo terminal. La colitis ulcerosa también puede llamarse colitis o proctitis. La inflamación hace que el colon se vacíe frecuentemente, causando diarrea. Se forman úlceras en lugares donde la inflamación ha eliminado las células que revisten el colon; las úlceras sangran y producen pus.

La colitis ulcerosa puede suceder en personas de cualquier edad, pero más a menudo comienza entre las edades de 15 y 30, o menos frecuentemente entre las edades de 50 y 70. Los niños y adolescentes a menudo desarrollan la enfermedad. La colitis ulcerosa afecta a hombres y mujeres por igual y parece transmitirse de padres a hijos en algunas familias. Abundan las teorías acerca de las causas de la colitis ulcerosa, pero nadie las ha demostrado. La teoría más popular es que el sistema inmunitario del organismo reacciona a un virus o a una bacteria usando inflamación continuada en la pared intestinal. Las personas con colitis ulcerosa tienen anomalías del sistema inmunitario, pero los doctores no conocen si estas anomalías son una causa o un resultado de la enfermedad. La colitis ulcerosa no está causada por angustia emocional o sensibilidad a ciertos alimentos o productos alimenticios, pero estos factores pueden desencadenar síntomas en algunas personas.

Los síntomas más comunes de colitis ulcerosa son dolor abdominal y diarrea sangrante. Los pacientes también pueden experimentar fatiga, pérdida de peso, pérdida de apetito, sangrado rectal, y pérdida de fluidos corporales y nutrientes. Aproximadamente la mitad de los pacientes tienen síntomas leves. Otros padecen fiebre frecuente, diarrea sangrante, náuseas, y calambres abdominales intensos. La colitis ulcerosa también puede causar problemas tales como artritis, inflamación del ojo, enfermedad hepática (hepatitis, cirrosis y colangitis esclerosante primaria), osteoporosis, erupciones cutáneas, y anemia. Nadie sabe de forma segura por qué aparecen problemas fuera del colon. Los científicos creen que estas complicaciones pueden suceder cuando el sistema inmunitario activa la inflamación en otras partes del organismo. Algunos de estos problemas se van cuando se trata la colitis.

Puede requerirse un examen físico exhaustivo y una serie de ensayos para diagnosticar la colitis ulcerosa. Pueden hacerse pruebas sanguíneas para comprobar la anemia, que podría indicar sangrado en el colon o recto. Las pruebas de sanguíneas también pueden descubrir un alto recuento de glóbulos blancos, que es un signo de inflamación en alguna parte del organismo. Ensayando una muestra de deposición, el doctor puede detectar sangrado o infección en el colon o recto. El doctor puede hacer una colonoscopia o sigmoidoscopia. Para cualquier ensayo, el doctor inserta un endoscopio-un tubo iluminado, flexible y largo conectado a un ordenador y monitor de TV, en el ano para ver el interior del colon y el recto. El doctor será capaz de ver cualquier inflamación, sangrado, o úlcera en la pared del colon. Durante el examen, el doctor puede hacer una biopsia, que implica tomar una muestra de tejido del revestimiento del colon para verla con un microscopio. También puede requerirse una placa de rayos-x con enema de bario del colon. Este procedimiento implica llenar el colon con bario, una solución blanca de aspecto

yesoso. El bario se muestra blanco en película de rayos-x, permitiendo al doctor una visión clara del colon, incluyendo cualquier úlcera u otra anomalía que puede haber.

El tratamiento de la colitis ulcerosa depende de la gravedad de la enfermedad. Muchas personas se tratan con medicación. En varios casos, un paciente puede necesitar cirugía para retirar el colon enfermo. La cirugía es la única cura para la colitis ulcerosa. Algunas personas cuyos síntomas se desencadenan por ciertos alimentos son capaces de controlar los síntomas evitando alimentos que alteren sus intestinos, como alimentos altamente sazonados, frutas y vegetales sin procesar, o azúcar de la leche (lactosa). Cada persona puede experimentar la colitis ulcerosa de forma diferente, de modo que se ajusta el tratamiento para cada individuo. Es importante el apoyo emocional y psicológico. Algunas personas tienen remisiones - periodos en que los síntomas se van - que duran meses o incluso años. Sin embargo, los síntomas de la mayoría de los pacientes finalmente vuelven. Este patrón de cambio de la enfermedad significa que uno nunca puede saber cuánto ha ayudado un tratamiento. Algunas personas con colitis ulcerosa pueden necesitar cuidados médicos durante algún tiempo, con visitas regulares al doctor para controlar la afección.

El objetivo de la terapia es inducir y mantener la remisión, y mejorar la calidad de vida de personas con colitis ulcerosa. Están disponibles varios tipos de fármacos:

- Aminosalicilatos - fármacos que contienen ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), ayudan a controlar la inflamación. La sulfasalazina es una combinación de sulfapiridina y 5-ASA y se usa para inducir y mantener la remisión. El componente sulfapiridina transporta el 5-ASA antiinflamatorio al intestino. Sin embargo, la sulfapiridina puede conducir a efectos secundarios tales como incluyendo náuseas, vómitos, acidez, diarrea, y cefalea. Otros agentes 5-ASA tales como olsalazina, mesalamina, y balsalazida, tienen un vehículo diferente, ofrecen menos efectos secundarios, y pueden usarse por personas que no pueden tomar sulfasalazina. Los 5-ASA se dan por vía oral, a través de un enema, en un supositorio, dependiendo de la localización de la inflamación en el colon. La mayoría de las personas con colitis ulcerosa leve o moderada se tratan con este grupo de fármacos en primer lugar.
- Corticosteroides - tales como prednisona e hidrocortisona también reducen la inflamación. Pueden usarse por personas que tienen colitis ulcerosa moderada a grave o que no responden a fármacos 5-ASA. Los corticosteroides, también conocidos como esteroides, pueden darse por vía oral, intravenosa, a través de un enema, o en un supositorio, dependiendo de la localización de la inflamación. Estos fármacos pueden causar efectos secundarios tales como ganancia de peso, acné, vello facial, hipertensión, cambios de humor, y un riesgo aumentado de infección. Por esta razón, no se recomiendan para uso a largo plazo.
- Inmunomoduladores - tales como azatioprina y 6-mercaptopurina (6-MP) reducen la inflamación afectando al sistema inmunitario. Se usan para pacientes que no han respondido a 5-ASA o corticosteroides o que son dependientes de corticosteroides. Sin embargo, los inmunomoduladores son de acción lenta y pueden tardar 6 meses antes de observarse un beneficio completo. Los pacientes que toman estos fármacos se controlan para complicaciones incluyendo pancreatitis y hepatitis, un recuento reducido de glóbulos blancos, y un riesgo aumentado de infección. Puede usarse ciclosporina A con 6-MP o azatioprina para tratar colitis ulcerosa grave activa en personas que no responden a corticosteroides intravenosos.

Pueden darse otros fármacos para relajar al paciente o aliviar el dolor, diarrea, o infección.

Ocasionalmente, los síntomas son tan graves que la persona debe hospitalizarse. Por ejemplo, una persona puede tener un sangrado grave o diarrea grave que cause deshidratación. En dichos casos, el doctor intentará detener la diarrea y la pérdida de sangre, fluidos, y sales minerales. El paciente puede necesitar una dieta especial, alimentarse a través de vena, medicaciones, o a veces cirugía.

A aproximadamente el 25-40 % de los pacientes con colitis ulcerosa finalmente se les deberán retirar sus cólores a causa de hemorragia masiva, enfermedad severa, rotura del colon, o riesgo de cáncer. Algunas veces el doctor recomendará retirar el colon si los tratamientos médicos fracasan o si los efectos secundarios de los corticosteroides u otros fármacos amenazan la salud del paciente. La cirugía para retirar el colon y el recto, conocida como proctocolectomía, va seguida por uno de los siguientes:

- Ileostomía, en que el cirujano crea una pequeña abertura en el abdomen llamada estoma, y une el extremo del intestino delgado llamado el íleon, al mismo. Los residuos viajarán a través del intestino delgado y saldrán del cuerpo a través del estoma. El estoma es de aproximadamente el tamaño de una cuarta parte y está habitualmente localizada en la parte derecha inferior del abdomen cerca de la zona de la cintura. Se cose una bolsa sobre la abertura para recoger los residuos, y el paciente vacía la bolsa según lo necesario.
- Anastomosis ileonal, u operación de reposición, que permite al paciente tener movimientos intestinales normales porque conserva parte del ano. En esta operación, el cirujano retira la parte enferma del colon y el interior del recto dejando los músculos exteriores del recto. El cirujano después une el íleon al interior del recto y el ano creando una bolsa. Los residuos se almacenan en la bolsa y pasan a través del ano del modo habitual. Los movimientos del intestino pueden ser más frecuentes y acuosos que antes del procedimiento. La inflamación de la bolsa (pouchitis) es una posible complicación.

No todas las operaciones son apropiadas para todas las personas. Qué cirugía adoptar depende de la gravedad de la enfermedad y las necesidades del paciente, las expectativas y el estilo de vida. Las personas que afrontan esta decisión obtendrán la máxima información posible hablando con sus doctores, las enfermeras que trabajan con pacientes de cirugía de colon (terapeutas enterostomales), y con otros pacientes de cirugía de colon. Las organizaciones de apoyo al paciente pueden dirigir a las personas a grupos de apoyo y otras fuentes de información.

La mayoría de las personas con colitis ulcerosa nunca necesitarán una cirugía. Si llega a convertirse en necesaria la cirugía, sin embargo, algunas personas encontrarán malestar en saber que después de la cirugía, la colitis se cura y la mayoría de las personas vive una vida normal, vidas activas.

B. Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn se caracteriza por inflamación intestinal y el desarrollo de estenosis intestinal y fístulas; la neuropatía a menudo acompaña estos síntomas. Una hipótesis para la etiología de la enfermedad de Crohn es que un fallo de la barrera mucosa intestinal, posiblemente resultante de susceptibilidades genética y factores ambientales (por ejemplo, hábito de fumar), expone al sistema inmunitario a antígenos del lumen intestinal incluyendo antígenos bacterianos y alimenticios (por ejemplo, Soderholm y col., 1999; Hollander y col., 1986; Hollander, 1992). Otra hipótesis es que la infección intestinal persistente por patógenos tales como *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* anormal, o paramixovirus, estimula la respuesta inmunitaria; o como alternativa, los síntomas resultan de una respuesta inmunitaria mal regulada a antígenos ubicuos, tales como microflora intestinal normal y los metabolitos y toxinas que producen (Sartor, 1997). La presencia de anticuerpos IgA e IgG anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) en el suero se encontró que era en gran medida diagnóstica de enfermedad de Crohn pediátrica (Ruemmele y col., 1998; Hoffenberg y col., 1999).

Recientes esfuerzos por desarrollar herramientas de diagnóstico y tratamiento contra enfermedad de Crohn se han centrado en el papel central de las citoquinas (Schreiber, 1998; van Hogezaand y Verspaget, 1998). Las citoquinas son proteínas o factores secretados pequeños (5 a 20 kD) que tienen efectos específicos sobre las interacciones célula a célula, comunicación intercelular, o el comportamiento de otras células. Las citoquinas se producen por linfocitos, especialmente linfocitos T_H1 y T_H2 , monocitos, macrófagos intestinales, granulocitos, células epiteliales, y fibroblastos (revisado en Rogler y Andus, 1998; Galley y Webster, 1996). Algunas citoquinas son proinflamatorias (por ejemplo, TNF- α , IL-1(α y β), IL-6, IL-8, IL-12, o factor inhibidor de leucemia (LIF)); otras son antiinflamatorias (por ejemplo, antagonistas del receptor de IL-1, IL-4, IL-10, IL-11, y TNF- β). Sin embargo, pueden solapar y tener redundancia funcional en sus efectos en ciertas afecciones inflamatorias.

En casos activos de enfermedad de Crohn, se secretan concentraciones elevadas de TNF- α e IL-6 en la circulación sanguínea, y se producen TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-8 en exceso de forma local por células de la mucosa (*id.*; Funakoshi y col., 1998). Estas citoquinas pueden tener efectos de largo alcance sobre sistemas fisiológicos incluyendo el desarrollo de huesos, hematopoyesis, y la función hepática, de tiroides, y neuropsiquiátrica. Además, un desequilibrio de la relación IL-1 β /IL-1ra, en favor de IL-1 β proinflamatoria, se ha observado en pacientes con enfermedad de Crohn (Rogler y Andus, 1998; Saiki y col., 1998; Dionne y col., 1998; pero véase Kuboyama, 1998). Un estudio sugirió que los perfiles de citoquinas en muestras de deposición podrían ser una herramienta útil de diagnóstico para enfermedad de Crohn (Saiki y col., 1998).

Los fármacos antiinflamatorios, tales como 5-aminosalicilatos (por ejemplo, mesalamina) o corticosteroides, típicamente se prescriben, pero no siempre son eficaces (revisado en Botoman y col., 1998). La inmunosupresión con ciclosporina a veces es beneficiosa para pacientes resistentes a o intolerantes a corticosteroides (Brynskov y col., 1989). En la enfermedad de Crohn, se distorsiona una respuesta inmunitaria mal regulada hacia inmunopatología mediada por células (Murch, 1998). Pero los fármacos inmunosupresores, tales como ciclosporina, tacrolimus, y mesalamina se han usado para tratar casos resistentes a corticosteroides de enfermedad de Crohn con éxito desigual (Brynskov y col., 1989; Fellerman y col., 1998). No obstante, la corrección quirúrgica finalmente es necesaria en el 90 % de los pacientes; el 50 % experimentan resección colónica (Leiper y col., 1998; Makowiec y col., 1998). La tasa de recidiva después de cirugía es alta, requiriendo el 50 % cirugía adicional en 5 años (Leiper y col., 1998; Besnard y col., 1998). Otras terapias incluyen el uso de diversos antagonistas de citoquinas (por ejemplo, IL-1 ra), inhibidores (por ejemplo, de la enzima convertidora de IL-1 β y antioxidantes) y anticuerpos anticitoquina (Rogler y Andus, 1998; van Hogezaand y Verspaget, 1998; Reimund y col., 1998; Luger y col., 1998; McAlindon y col., 1998). Se han intentado los anticuerpos monoclonales contra TNF- α con algún éxito en el tratamiento de enfermedad de Crohn (Targan y col., 1997; Stack y col., 1997; van Dulleman y col., 1995).

Otro enfoque para el tratamiento de enfermedad de Crohn se ha centrado en erradicar al menos parcialmente la comunidad bacteriana que puede activar la respuesta inflamatoria y reemplazarla con una comunidad no patogénica. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.599.795 desvela un procedimiento para la prevención y tratamiento de enfermedad de Crohn en pacientes humanos. Este procedimiento se dirigió a esterilizar el tracto intestinal con al menos un antibiótico y al menos un agente antifúngico para eliminar la flora existente y reemplazarla con diferentes bacterias seleccionadas y bien caracterizadas tomadas de seres humanos normales. Borody mostró un procedimiento de tratamiento de enfermedad de Crohn por eliminación al menos parcial de la microflora intestinal existente por lavado y remplazo con una nueva comunidad bacteriana introducida por inóculo fecal a partir de un donante humano explorado para enfermedad o por una composición que comprende especies de *Bacteroides* y

Escherichia coli (patente de Estados Unidos 5.443.826). Sin embargo, no se ha sabido la causa de la enfermedad de Crohn a la que poder dirigir el diagnóstico y/o tratamiento.

C. Síndrome del intestino irritable

5 El síndrome del intestino irritable, o SII, es un problema que afecta principalmente al intestino o intestino grueso. La palabra síndrome implica un grupo de síntomas, y SII es un síndrome porque puede causar varios síntomas. Por ejemplo, SII causa calambres, hinchazón, gases, diarrea, y estreñimiento. SII no es una enfermedad es un trastorno funcional que significa que el intestino no trabaja como debería.

10 Con SII, los nervios y músculos en el intestino están extrasensibles. Por ejemplo, los músculos pueden contraerse demasiado después de comer. Estas contracciones pueden causar calambres y diarrea durante o poco después de una comida. O los nervios pueden ser demasiado sensibles al estiramiento del intestino (a causa de gases, por ejemplo). Pueden producirse calambres o dolor. El estrés emocional no causará que una persona desarrolle SII. Pero si ya se tiene SII, el estrés puede activar los síntomas. De hecho, el intestino puede reaccionar excesivamente a todo tipo de cosas, incluyendo alimentos, ejercicio, y hormonas. Los alimentos que tienden a causar síntomas incluyen producto de leche, chocolate, alcohol, cafeína, bebidas carbonatadas, y alimentos grasos. En algunos casos, comiendo simplemente una comida grande se activarán los síntomas. Las mujeres con SII a menudo tienen más síntomas durante sus períodos menstruales.

20 Los síntomas principales de SII son dolor de tipo calambres en el área del estómago (abdomen), diarrea dolorosa o estreñimiento, mucosidad en las deposiciones, abdomen inflamado o hinchado, y la sensación de que no haya finalizado el movimiento intestinal. SII no se cura, pero se pueden hacer cosas para aliviar los síntomas. El tratamiento puede implicar cambios en la dieta, medicina y alivio del estrés. Una combinación de cosas puede funcionar mejor.

25 Algunos alimentos que pueden causar síntomas son comidas grasas, como patatas fritas, productos lácteos como queso o helado, chocolate, alcohol, cafeína y bebidas carbonatadas como soda. Por el contrario, algunos alimentos ayudarán a SII. La fibra reduce los síntomas de SII - especialmente el estreñimiento - porque hace que las deposiciones sean más blandas, voluminosas, y fáciles de evacuar. La fibra se encuentra en salvado, pan, cereal, alubias, fruta, y vegetales. Añadir alimentos con fibra a la dieta debe hacerse gradualmente, permitiendo que el cuerpo se acostumbre a ellos. Demasiada fibra toda de una vez puede causar gases, que puede activar los síntomas en una persona con SII. Además de mencionar más alimentos con fibra, el doctor también podría prescribir una píldora de fibra o agua de bebida mezclada con un polvo especial alto en fibra.

30 Comidas grandes pueden causar calambres y diarrea en personas con SII. Si esto sucede se recomienda cuatro o cinco comidas más pequeñas al día, o simplemente comer menos en cada comida. Si fuera necesario, el doctor puede prescribir medicinas para ayudar con los síntomas, tales como laxantes para tratar el estreñimiento, antiespasmódicos para ralentizar las contracciones en el intestino, que ayuda con la diarrea y el dolor, y antidepresivos para ayudar a aquellos que tienen dolor severo.

35 D. Enterocolitis necrotizante

La enterocolitis necrotizante es una enfermedad adquirida, principalmente en bebés prematuros o recién nacidos enfermos, en que muere tejido intestinal. En la enterocolitis necrotizante, el revestimiento de la pared intestinal muere y el tejido se desprende. La causa para este trastorno es desconocida, pero se cree que un flujo disminuido de sangre al intestino evita que el intestino produzca la mucosidad protectora normal. Las bacterias en el intestino también pueden ser una causa. Están en riesgo bebés prematuros pequeños, bebés que se alimentan de fórmulas concentradas, bebés en una guardería donde ha sucedido un brote (que sugiere una causa infecciosa), y bebés que han recibido transfusiones de intercambio de sangre. La enterocolitis necrotizante es una enfermedad grave con una tasa de mortalidad que se aproxima al 25 %. El resultado se mejora por tratamiento prematuro y agresivo.

45 Los síntomas incluyen distensión abdominal, vómitos, intolerancia a la alimentación, sangre en las deposiciones, letargia, inestabilidad de temperatura, y diarrea. El diagnóstico habitualmente implica una placa abdominal de rayos-X, y examen para sangre oculta en las deposiciones, recuento elevado de glóbulos blancos, trombocitopenia, y acidosis láctica. En un bebé sospechoso de tener enterocolitis necrotizante, se detiene la alimentación y se alivia los gases del intestino insertando un pequeño tubo en el estómago. El fluido IV reemplaza la leche de fórmula o de la madre. Se inicia terapia con antibióticos. El estado del bebé se controla con placas abdominales de rayos-X, pruebas sanguíneas y gases en sangre. Si se desarrolla perforación intestinal (orificio) o peritonitis (inflamación de la pared abdominal), se indica cirugía. El tejido intestinal muerto se retira y se realiza una colostomía o ileostomía. El intestino después se reconecta varias semanas o meses después cuando se ha curado la infección e inflamación.

E. Enfermedad celíaca

55 La enfermedad celíaca es una enfermedad digestiva que daña el intestino delgado e impide la absorción de nutrientes desde los alimentos. Las personas que tienen enfermedad celíaca no pueden tolerar el gluten, una proteína encontrada en el trigo, centeno, y cebada. El gluten se encuentra principalmente en alimentos, pero también se encuentra en productos diarios tales como adhesivo de sellos y sobres, medicinas, y vitaminas. Cuando

las personas con enfermedad celíaca comen alimentos o usan productos que contienen gluten, su sistema inmunitario responde dañando el intestino delgado. Las protuberancias minúsculas, con forma de dedo que revisten el intestino delgado se dañan o destruyen. Las llamadas vellosidades, normalmente permiten que los nutrientes de los alimentos se absorban en el torrente sanguíneo. Sin vellosidades sanas, una persona queda malnutrida, independientemente de la cantidad de alimento comido.

Como el sistema inmunitario del propio organismo causa el daño, la enfermedad celíaca se considera un trastorno autoinmunitario. Sin embargo, también se clasifica como una enfermedad de mala absorción porque no se absorben nutrientes. La enfermedad celíaca también es conocida como esprúe celíaco, esprúe no tropical, y enteropatía sensible a gluten. La enfermedad celíaca es una enfermedad genética, que significa que continúa en las familias. Algunas veces, la enfermedad se activa o queda activa por primera vez después de cirugía, embarazo, nacimiento de un bebé, infección vírica, o estrés emocional grave.

Los datos sobre prevalencia de enfermedad celíaca son anecdóticos. En Italia, aproximadamente 1 de cada 250 personas y en Irlanda aproximadamente 1 de cada 300 personas tienen enfermedad celíaca. Recientes estudios han demostrado que puede ser más común en África, Sudamérica, y Asia que lo que se creía previamente. Hasta hace poco, se creía que la enfermedad celíaca no era común en los Estados Unidos. Sin embargo, estudios han demostrado que la enfermedad celíaca es muy común. Hallazgos recientes estiman que aproximadamente 2 millones de personas en Estados Unidos tienen enfermedad celíaca, o aproximadamente 1 de cada 133 personas. Entre las personas que tienen un pariente de primer grado diagnosticado con enfermedad celíaca, tanto como 1 de cada 22 personas puede tener la enfermedad. La enfermedad celíaca podría estar mal diagnosticada en Estados Unidos por varias razones incluyendo (i) los síntomas celíacos pueden atribuirse a otros problemas; (ii) muchos doctores no tienen conocimiento sobre la enfermedad; y (iii) solamente una pequeña cantidad de laboratorios de Estados Unidos están experimentados y especializados en el ensayo de enfermedad celíaca. Se necesita más investigación para conocer la prevalencia verdadera de la enfermedad celíaca entre los americanos.

La enfermedad celíaca afecta a las personas de forma diferente. Pueden aparecer síntomas en el sistema digestivo, o en otras partes del organismo. Por ejemplo, una persona podría tener diarrea y dolor abdominal, mientras que otra persona podría estar irritable o deprimida. De hecho, la irritabilidad es uno de los síntomas más comunes en niños. Los síntomas de enfermedad celíaca pueden incluir uno o más de los siguientes: gases, hinchazón y dolor abdominal recurrente, diarrea crónica, palidez, deposiciones malolientes o grasas, pérdida/ganancia de peso, fatiga, anemia inexplicada, dolor óseo o articular, osteoporosis, osteopenia, cambios en el comportamiento, entumecimiento de las piernas (por daño nervioso), calambres musculares, convulsiones, períodos menstruales ausentes (a menudo a causa de excesiva pérdida de peso), infertilidad, abortos recurrentes, crecimiento retardado, retraso en el desarrollo en bebés, llagas pálidas dentro de la boca (llamadas úlceras aftosas), decoloración de los dientes o pérdida de esmalte, y erupción cutánea pruriginosa (dermatitis herpetiforme).

Una persona con enfermedad celíaca puede no tener síntomas. Las personas sin síntomas aún están en riesgo de las complicaciones de la enfermedad celíaca, incluyendo malnutrición. Cuanto más tiempo permanece una persona sin diagnosticar y sin tratar, mayor es la probabilidad de desarrollar malnutrición y otras complicaciones. La anemia, crecimiento retardado, y pérdida de peso son signos de malnutrición. El organismo no está obteniendo suficientes nutrientes. La malnutrición es un problema grave en niños porque necesitan nutrición adecuada para desarrollarse apropiadamente.

La cantidad de tiempo que una persona se alimenta de leche materna, la edad en que una persona empieza a comer alimentos que contienen gluten y la cantidad de alimentos que contienen gluten que se come son tres factores que se cree que desempeñan un papel en el momento y el modo en que aparece la celiaquía. Algunos estudios han demostrado, por ejemplo, que cuanto más tiempo está una persona alimentándose de leche materna, más tarde aparecen los síntomas de enfermedad celíaca y más infrecuentes son los síntomas.

Reconocer la enfermedad celíaca puede ser difícil porque algunos de sus síntomas son similares a los de otras enfermedades. De hecho, algunas veces la enfermedad celíaca se confunde con síndrome del intestino irritable, anemia por deficiencia de hierro causada por pérdida de sangre menstrual, enfermedad de Crohn, diverticulitis, infecciones intestinales, y síndrome de fatiga crónica. Como resultado, la enfermedad celíaca a menudo está sin diagnosticar o mal diagnosticada.

Recientemente, los investigadores descubrieron que personas con enfermedad celíaca tienen niveles mayores de los normales de ciertos anticuerpos en la sangre. Los anticuerpos son proteínas protectoras producidas por el sistema inmunitario en respuesta a sustancias que el organismo percibe como amenazantes. Los autoanticuerpos son proteínas que reaccionan contra las moléculas o tejidos del propio organismo. Para diagnosticar la enfermedad celíaca los médicos habitualmente ensayan la sangre para medir los niveles de inmunoglobulina A (IgA), anticuerpos antitransglutaminasa tisular (tTGA) e IgA antiendomiso (AEA). Antes de ensayarse, se debe seguir comiendo una dieta normal que incluya alimentos con gluten, tal como panes y pastas. Si una persona deja de comer alimentos con gluten antes del ensayo, los resultados pueden ser negativos para enfermedad celíaca incluso si realmente está presente la enfermedad celíaca.

Si los ensayos y síntomas sugieren enfermedad celíaca, el doctor realizará una biopsia de intestino delgado. Durante la biopsia el doctor retira un trozo pequeño de tejido del intestino delgado para comprobar el daño a las vellosidades. Para obtener la muestra tisular, el doctor facilita un endoscopio a través de la boca y el estómago hasta el intestino delgado. Usando instrumentos pasados a través del endoscopio, el doctor entonces toma la muestra.

La detección de enfermedad celíaca implica ensayar la presencia de anticuerpos en la sangre de personas sin síntomas. Los americanos no se exploran de forma rutinaria para enfermedad celíaca. El ensayo para anticuerpos relacionados con celiaquía en niños menores de 5 años de edad puede no ser fiable. Sin embargo, como la enfermedad celíaca es hereditaria, los miembros de la familia, particularmente los parientes de primer grado-que significa progenitores, hermanos, o niños de personas que se han diagnosticado-pueden desear un ensayo para la enfermedad. Aproximadamente del 5 al 15 por ciento de un pariente de primer grado de una persona afectada también tendrá la enfermedad. De aproximadamente el 3 al 8 por ciento de personas con diabetes tipo 1 tendrá enfermedad celíaca confirmada por biopsia y del 5 al 10 por ciento de las personas con síndrome de Down se diagnosticará con enfermedad celíaca.

El único tratamiento para la enfermedad celíaca es seguir una dieta sin gluten. Cuando una persona se diagnostica por primera vez con enfermedad celíaca, el doctor habitualmente pide a la persona que trabaje con un dietista sobre un plan de dieta sin gluten. Un dietista es un profesional sanitario que está especializado en alimentación y nutrición. Algunas personas con enfermedad celíaca pueden aprender de un dietista el modo de leer listas de ingredientes e identificar alimentos que contienen gluten para tomar decisiones informadas en la tienda de comestibles y cuando comen fuera. La mayoría de las personas, siguiendo esta dieta detendrán los síntomas, curaran el daño intestinal existente, y evitarán daño adicional. Las mejoras comienzan en días de comenzar la dieta. El intestino delgado habitualmente se cura completamente en 3 a 6 meses en niños y adultos más jóvenes y en 2 años en adultos mayores. Curado significa una persona que ahora tiene vellosidades que pueden absorber nutrientes de los alimentos al torrente sanguíneo.

Para permanecer bien, las personas con enfermedad celíaca deben evitar el gluten durante el resto de sus vidas. Comer algo de gluten, no importa como de pequeña sea la cantidad, puede dañar el intestino delgado. El daño sucederá en cualquiera con la enfermedad incluyendo personas sin síntomas apreciables. Dependiendo de la edad de la personas en el diagnóstico, algunos problemas no mejorarán, tales como el crecimiento retardado y la decoloración de los dientes.

Algunas personas con enfermedad celíaca no muestran mejora con la dieta sin gluten. La afección se llama enfermedad celíaca insensible. La razón más común para una mala respuesta es que pequeñas cantidades de gluten aún están presentes en la dieta. Las advertencias de un dietista que está especializado en la educación de pacientes a cerca de la dieta sin gluten es esencial para conseguir los mejores resultados.

Raramente, la lesión intestinal continuará a pesar de una dieta estrictamente sin gluten. Las personas en esta situación tienen intestinos gravemente dañados que no pueden curar. Como sus intestinos no están absorbiendo suficientes nutrientes, necesitan recibir directamente nutrientes en sus torrentes sanguíneos a través de una vena (vía intravenosa). Las personas con esta afección pueden necesitar evaluarse para complicaciones de la enfermedad. Los investigadores ahora están evaluando tratamientos con fármacos para enfermedad celíaca insensible.

Una dieta sin gluten significa no comer alimentos que contengan trigo (incluyendo espelta, triticale, y kamut), centeno, y cebada. Los alimentos y productos hechos a partir de estos cereales tampoco están permitidos. En otras palabras, una persona con enfermedad celíaca no debe comer la mayoría de las semillas, pastas, cereales, y muchos alimentos procesados. A pesar de estas restricciones, las personas con enfermedad celíaca pueden comer una dieta bien equilibrada con una diversidad de alimentos incluyendo pan y pasta sin gluten. Por ejemplo, las personas con enfermedad celíaca pueden usar patata, arroz, soja, amaranto, quinoa, alforfón, o harina de judía en lugar de harina de trigo. Pueden compra pan, pasta, y otros productos sin gluten de tiendas que tienen alimentos orgánicos, u otros productos de compañías alimenticias especiales. Los productos sin gluten están disponibles de forma creciente en tiendas normales. El gluten también se usa en algunas medicaciones. Debe comprobarse con el farmacéutico para saber si las medicaciones usadas contienen gluten. Como el gluten también se usa a veces como aditivo en productos inesperados, es importante leer todas las etiquetas. Si los ingredientes no están enumerados en la etiqueta del producto, el fabricante del producto debe proporcionar la lista a petición. Con la práctica, la detección de gluten se convierte en una segunda naturaleza.

El daño al intestino delgado y los problemas resultantes de absorción de nutrientes ponen a una persona con enfermedad celíaca en riesgo de malnutrición y anemia así como varias enfermedades y problemas de salud. El linfoma y adenocarcinoma son cánceres que pueden desarrollarse en el intestino. La osteoporosis es una afección en que los huesos se vuelven débiles, quebradizos, y propensos a rotura. Una mala absorción de calcio contribuye a la osteoporosis. Los abortos y malformaciones congénitas de los bebés, tales como defectos del tubo neural, son riesgos para mujeres embarazadas con enfermedad celíaca no tratada a causa de problemas de absorción de nutrientes. La corta estatura se refiere a ser de altura significativamente por debajo del promedio. La corta estatura se produce cuando la enfermedad celíaca en la niñez evita la absorción de nutrientes durante los años en que la

nutrición es crítica para el crecimiento y desarrollo normales de un niño. Los niños que se diagnostican y tratan antes de que se detenga su crecimiento pueden tener un período de recuperación. Las personas con enfermedad celíaca también tienden a tener otras enfermedades autoinmunitarias. La relación entre la enfermedad celíaca y estas enfermedades puede ser genética. Estas enfermedades incluyen enfermedad de tiroides, lupus sistémico eritematoso, diabetes tipo 1, enfermedad hepática, enfermedad vascular del colágeno, artritis reumatoide y síndrome de Sjögren.

F. Enteropatía por VIH

La enteropatía por VIH es un síndrome caracterizado por diarrea crónica bien establecida (mayor de un mes de duración) sin una causa infecciosa identificada después de evaluación minuciosa, en un individuo VIH positivo. Se cree que se debe a efectos directos o indirectos de VIH sobre la mucosa entérica. La enteropatía por VIH es un diagnóstico de exclusión y puede hacerse solo después de haber descartado otras formas de enfermedad diarreica. Se presenta con una patología similar a la de enfermedad celíaca, y se han sugerido dietas sin gluten para tratar el trastorno.

G. Gastritis por *Helicobacter*

Helicobacter pylori puede causar infecciones del estómago que pueden contribuir al desarrollo de dispepsia (acidez, hinchazón y náuseas), gastritis (inflamación del estómago), y úlceras en el estómago y el duodeno. *H. pylori* es una bacteria frágil que ha encontrado un hogar ideal en la capa mucosa protectora del estómago. Estas bacterias tienen largos hebras que sobresalen de las mismas para unirse a las células subyacentes del estómago. La capa mucosa que protege las células del estómago del ácido también protege a *H. pylori*. Estas bacterias realmente no invaden las células del estómago como pueden otras ciertas bacterias. La infección, sin embargo, es muy real y no causa que el organismo reaccione. Los glóbulos blancos que combaten la infección se mueven al área, y el organismo desarrolla anticuerpos contra *H. pylori* en la sangre.

La infección por *H. pylori* probablemente sucede cuando un individuo traga las bacterias en el alimento o en utensilios contaminados. La infección probablemente es una de las más comunes en el mundo, aumenta con la edad, y también se encuentra en personas jóvenes en países en desarrollo. En muchos casos no produce síntomas, e incluso si es sintomática, la infección permanece localizada en el área gástrica, y persiste salvo que se dé tratamiento específico. La infección por *H. pylori* puede diagnosticarse por biopsia endoscópica seguida por ensayo del tejido retirado para las bacterias, un ensayo de aliento, o una prueba sanguínea (que mide anticuerpos contra estas bacterias presentes en la sangre).

Los síntomas incluyen malestar, hinchazón, náuseas y quizá vómitos, así como úlceras. Los síntomas pueden aliviarse por antiácidos, leche, u otras medicaciones que reducen la acidez del estómago. Con úlceras estomacales, la infección por *H. pylori* se encuentra en el 60 al 80 % de los casos. Más del 90 % de todos los pacientes que desarrollan úlceras duodenales también tienen infección por *H. pylori* en el estómago. Los médicos ahora aceptan el hecho de que la infección está directamente relacionada con el desarrollo de úlceras duodenales. Es bastante fácil eliminar las úlceras duodenales con medicinas fuertes que reducen la acidez, pero las úlceras sufrirán recidiva salvo que también se elimine la infección por *H. pylori*. Además, se conocen dos tipos de cáncer relacionados con infección con *H. pylori*—cáncer de estómago y linfoma.

Si no existen síntomas, un doctor puede decidir que no necesita darse tratamiento. De forma creciente, los médicos están tratando las úlceras agudas con medicinas que reducen la acidez tratando al mismo tiempo la infección por *H. pylori* con antibióticos, incluyendo un compuesto de bismuto disponible sin receta como Pepto-Bismol. Normalmente, se usan varios fármacos antibióticos juntos para prevenir que las bacterias desarrollen resistencia a uno cualquiera de ellos.

H. Enteropatía/enteritis por AINE

Las propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas de los AINE están bien establecidas y pueden usarse en una amplia gama de trastornos. La utilidad clínica de cualquier fármaco se determina por el compromiso entre su eficacia terapéutica y toxicidad. Si un AINE es eficaz, pero un paciente no puede tolerar sus efectos secundarios entonces el AINE no es de uso para el paciente. Una limitación principal de la utilidad clínica de los AINE es su toxicidad en el epitelio gastroduodenal. La toxicidad por AINE no es específica de sitio en el gastroduodeno, y puede inducir toxicidad en el intestino más distal.

I. Infecciones

También puede tratarse una diversidad de infecciones gastrointestinales usando las proteínas p40 y p75 o péptidos derivados de la presente invención. Estos incluyen agentes que causan gastroenteritis no inflamatoria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, y *Clostridium botulinum*), gastroenteritis inflamatoria (*Vibrio cholerae*, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroagregante, *Clostridium difficile*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus anthracis*, rotavirus, norovirus, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, y *Cyclospora cayentanensis*), y gastroenteritis invasiva (*Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia sp.*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori* y

Entamoeba histolytica). Dichas infecciones se tratan con tratamientos convencionales de antibióticos y combinación de antibióticos.

III. Terapias de combinación

Una composición peptídica de la presente invención puede administrarse en combinación con otro agente para el tratamiento de un trastorno de células epiteliales que implica apoptosis patológica. Combinando agentes, puede conseguirse un efecto aditivo sin aumentar al mismo tiempo la toxicidad (si la hay) asociada con una monoterapia. Además, es posible que puedan observarse efectos más que aditivos ("sinergia"). Por tanto, las terapias de combinación son un modo común de explotar los nuevos regímenes terapéuticos. En una realización, las composiciones peptídicas de la presente invención se usan en combinación con un agente terapéutico actualmente usado para tratar un TCE. Dicho enfoque puede inducir efectos aditivos o sinérgicos, o puede permitir el uso de dosis inferiores de cualquiera o ambos componentes, manteniendo de ese modo la eficacia reduciendo al mismo tiempo el potencial de efectos adversos causados por uno cualquiera de los componentes. En otra realización, los péptidos de la presente invención se administran a un paciente antes o después de cirugía para ayudar en un resultado quirúrgico eficaz a corto plazo o largo plazo. El tratamiento con péptido puede preceder, ser concurrente con y/o seguir al otro u otros agentes en intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones donde el tratamiento con péptido y otro u otros agentes se aplican por separado a una célula, tejido u organismo, generalmente se aseguraría que no pasa un período significativo de tiempo entre el momento de cada suministro, de modo que el tratamiento con péptido y el agente o agentes aún serían capaces de ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula, tejido u organismo. Por ejemplo, en dichos casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula, tejido u organismo con dos, tres, cuatro o más modalidades de forma sustancialmente simultánea (es decir, en menos de aproximadamente un minuto) con el tratamiento con péptido. En otros aspectos, puede administrarse uno o más agentes de forma sustancialmente simultánea, en aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 37 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 41 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 47 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, o aproximadamente 8 semanas o más, y cualquier intervalo derivable de los mismos, antes y/o después de administrar el péptido.

Pueden emplearse diversos regímenes de combinación del tratamiento con péptidos de la presente invención y uno o más agentes. Ejemplos no limitantes de dichas combinaciones se muestran a continuación, en los que un péptido de la presente invención es "A" y un agente diferente es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/BB/B B/A/B/B
B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Por tanto, las terapias con péptido de la presente invención pueden usarse junto con otras terapias que se usan para el tratamiento de trastornos analizados anteriormente. En particular, se contemplan antibióticos y agonistas de EGFR como agente de combinación apropiado.

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Debe apreciarse por los expertos en la materia que las técnicas desveladas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aún obtener un resultado parecido o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

Ejemplo 1 - Materiales y procedimientos

Preparación de cultivo bacteriano, sobrenadante de cultivo de caldo LGG (LGG-s), y medio de cultivo celular condicionado de LGG (LGG-CM). Se cultivaron *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactobacillus casei* 334, (ATCC 334), *Lactobacillus casei* 393, (ATCC 393) y *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) en caldo MRS de *Lactobacillus* a 37 °C (Yan y Polk, 2002; Miettinen y col., 1996) de acuerdo con las directrices de la ATCC. Las bacterias se recogieron del caldo MRS por centrifugación y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de la centrifugación se pasó LGG-s a través de un filtro de 0,2 µm. Se generaron LGG-CM incubando el LGG (10⁷ UFC/ml) en medio de cultivo celular RPMI o DMEM a 37 °C durante 2 horas; los medios después se centrifugaron dos veces y se filtró el sobrenadante (0,2 µm).

Purificación de proteínas del sobrenadante de cultivo LGG. Para purificar las proteínas en condiciones nativas del LGG-s, se cargó LGG-s en medio de intercambio iónico UNOsphere™ S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.) que se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas unidas se eluyeron usando Tris 30 mM, pH 7,3 que contenía concentraciones secuenciales de NaCl (100 mM a 800 mM). Las fracciones eluidas se recogieron y sometieron a SDS-PAGE y se tiñeron con el kit de tinción con azul coloidal (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Las fracciones eluidas que contenían proteínas después se concentraron usando dispositivos de filtro de centrifugación Amicon® Ultra-4 (Millipore, Bedford, MA), con un límite de corte de peso molecular de 5kDa, y se retuvo la fracción de peso molecular > 5kDa para estudio. Se determinaron las concentraciones de proteína usando un ensayo de proteína DC (Bio-Rad Laboratories). De 200 ml de cultivo de caldo LGG (10⁷ UFC/ml), se purificaron aproximadamente un 1 mg de p40 y 0,75 mg de p75. La concentración de las proteínas purificadas se ajustó a 0,1 mg/ml usando PBS.

Generación de anticuerpos e inmunorreducción de p75 y p40 de LGG-CM. Para preparar p75 y p40 como antígenos para generar anticuerpos, se separaron p75 y p40 purificados de forma cromatográfica en un gel de SDS-PAGE, y después se escindieron las bandas de p75 y p40 y se electroeluyeron de los geles usando un Electro-Eluter Modelo 422 (Bio-Rad Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se retiró el SDS en las fracciones eluidas por adsorbentes Bio-Beads® SM-2 (Bio-Rad Laboratories). Se generaron anticuerpos policlonales contra p75 y p40 inyectando a ratones las proteínas p75 y p40, respectivamente (Strategic Biosolutions, Newark, DE). Los anticuerpos contra p75 y p40 se conjugaron con perlas de proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) incubando los anticuerpos con perlas en PBS durante 2 horas a 4 °C. Para inmunoreducir de forma secuencial p75 y p40 de LGG-CM, se incubó LGG-CM con perlas conjugadas con anticuerpos anti-p75 durante 4 horas a 4 °C. Después de retirar las perlas conjugadas con anticuerpos anti-p75, se incubó CM con perlas conjugadas con anticuerpo anti-p40 durante otras 4 horas. Se usó suero preinmune como control negativo. Las cantidades de p75 y p40 presentes en LGG-CM o LGG-CM inmunoreducido se detectaron por análisis de transferencia de Western con anticuerpos anti-p75 y anti-p40.

Análisis de secuencia peptídica N-terminal e interna de p75 y p40. Se purificaron las proteínas p75 y p40 como se ha descrito anteriormente, se separaron por SDS-PAGE, y se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories, Inc). Se realizó el análisis de secuencia peptídica N-terminal de p75 y p40 por la metodología de degradación de Edman en la Iowa State University Protein Facility (Ames, IA). Las secuencias peptídicas internas de p75 y p40 se determinaron realizando digestión en gel de las proteínas con tripsina, seguido por análisis de los péptidos resultantes por desorción/ionización láser asistida por matriz, espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF/EM/EM), y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (CL/EM/EM) en la Vanderbilt University Proteomics Core of the Digestive Disease Research Center, Nashville, TN.

Análisis de los genes de LGG que codifican p75 y p40. Se compararon las secuencias peptídicas N-terminal e interna de p75 y p40 con secuencias proteicas de la base de datos de genoma microbiano del NCBI usando análisis BLAST. Las proteínas más estrechamente relacionadas estaban codificadas por dos genes en el genoma de *Lactobacillus casei* 334 (números de acceso a GenBank COG0791 y COG3883). Se diseñaron múltiples pares de cebadores basados en las secuencias de estos genes de *L. casei* y secuencias de ADN flanqueantes en el genoma de *L. casei*. Se aisló el ADN genómico de LGG usando el kit de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega Corporation, Madison, WI), y este ADN se usó como molde para PCR. Se realizó PCR durante 30 ciclos, incluyendo cada uno 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, y 30 segundos a 72 °C. Los productos de PCR se escindieron de los geles de agarosa y se purificaron usando un kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN Company, Valencia, CA). Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega Corporation), los plásmidos se transformaron en *E. coli* DH5α, y después se determinaron las secuencias de nucleótidos.

Cultivo celular y tratamiento celular. Se mantuvieron células epiteliales de colon de ratón adulto joven (YAMC) o supresor de quinasa de células epiteliales de colon de ratón (MCE) knock-out para Ras (KSR^{-/-}) en medio RPMI 1640 con FBS al 5 % y 5 U/ml de interferón murino (IFN-γ) en placas recubiertas con colágeno y se cultivaron en condiciones permisivas a 33 °C con CO₂ al 5% (Yan y col., 2004). Antes de todos los experimentos, las células se transfirieron a condiciones de 37 °C (no permisivas) con FBS al 0,5 %, medio sin IFN-γ durante 16 horas. La línea celular de carcinoma epitelial de colon humano, células HT29, se cultivó en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % a 37 °C. Las células se privaron de suero (0,5 %) a 37 °C durante 16 horas antes de los experimentos. Las células se trataron con p75, p40 purificados, LGG-CM o 10⁷ UFC/ml de bacteria (relación 20:1 de bacterias a células) durante 2 horas, o una hora antes de tratamiento con TNF (100 ng/ml). Para comparar los efectos de los factores

solubles, las células se cultivaron en transpocillos con bacterias colocadas en la cámara superior, separadas por un filtro permeable (tamaño de poro de 0,2 μm).

Preparación de lisados celulares. Después del tratamiento, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo y después se rasparon en tampón de lisis celular [HEPES 20 mM (pH 7,5), ortovanadato 1 mM, β -glicerolfosfato 50 mM, pirofosfato sódico 10 mM, con leupeptina (10 $\mu\text{g/ml}$), aprotinina (10 $\mu\text{g/ml}$), PMSF (18 $\mu\text{g/ml}$), y Triton-X-100 al 1 %]. Las suspensiones raspadas se centrifugaron (14.000 x g, 10 min) a 4 °C y se determinó el contenido de proteínas usando ensayo de proteína DC (Bio-Rad Laboratories). Los lisados celulares se mezclaron con tampón de muestra de Laemmli y las proteínas se separaron por SDS-PAGE para análisis de transferencia de Western con anti-p75, anti-p40, anti-fosfo-Ser 473 (P)-Akt, anti-Akt, anti-fosfo-Tyr180/182 (P)-p38 MAPK, anti-inhibidor de factor nuclear $\text{kB}(\text{I}\kappa\text{B})\alpha$ (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), y anti-fosfo-Thr183/Tyr185 (P)-quinasa regulada por señal extracelular (ERK)1/2 MAPK (Promega, Madison, WI).

Cultivo orgánico de colon. Todos los experimentos en animales se realizaron de acuerdo con protocolo aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee en Vanderbilt University. Se sacrificaron ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad, se abrió el colon y se lavó con PBS estéril y medio DMEN, y después se cortó en trozos de 4 x 4 mm. Los explantes de colon se superpusieron sobre insertos Netwell™ (tamaño de malla de membrana de 500 μm , Corning Incorporated Life Sciences, Acton, MA) con la capa serosa enfocada hacia el inserto. Se llenó DMEN que contenía FBS al 0,5 % hasta un punto justo sobre el epitelio y se incubó a 37 °C con CO_2 al 5 % durante 2 horas antes del tratamiento. Al final del experimento, se fijó el tejido de colon en paraformaldeído al 4 % a 4 °C durante una noche antes del seccionamiento. Se tiñeron secciones tisulares incrustadas en parafina con hematoxilina y eosina para evaluación por microscopia óptica de lesión epitelial, o para ensayos de apoptosis.

Ensayos de apoptosis. Se detectó la apoptosis en portaobjetos de tejido de colon por kit de ligamiento de oligos *in situ* (ISOL) ApopTag™ (Intergen Company, Purchase, NY) usando ADN ligasa T4 de acuerdo con las directrices del fabricante, o usando tinción con anticuerpo anti caspasa 3 activa (BD Biosciences, Palo Alto, CA) y reactivos proporcionados en el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Se usó microscopia de contraste de interferencia diferencial (DIC) como los inventores han informado previamente (Yan y col., 2004). Las células apoptóticas se determinaron contando la cantidad absoluta de células teñidas positivas en al menos 300 criptas colónicas.

Se detectó apoptosis en líneas celulares por dos procedimientos. Lo kits de detección de apoptosis *in situ* ApopTag (TUNEL, Intergen Company, Purchase, NY) y tinción DAPI se describieron previamente (Yan y col., 2004; Yan y col., 2001). Los portaobjetos se observaron por microscopia de fluorescencia, y se contó la cantidad de células teñidas positivas dentro de una población de al menos 500 células para determinar la proporción de células apoptóticas. Para tinción con Anexina V-FITC, se disociaron las células unidas usando Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc. San Diego, CA) y se tiñeron doblemente con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (Calbiochem/EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante respectivo. El porcentaje de células positivas para Anexina V-FITC y yoduro de propidio se determinó por citometría de flujo.

Ensayos de proliferación celular. Después de cultivarse celulares YAMC en placas de 96 pocillos se trataron con LGG, p75 purificado, o p40 purificado durante 24 horas, las células se incubaron con reactivo de una solución CellTiter 96@AQUEOUS (Promega Corp., Madison, WI) durante una hora para marcar las células viables. Se detectó la absorbancia a 590 nm usando un lector de placa de 96 pocillos. Se determinaron las cantidades de células comparando la absorbancia de muestras con la curva patrón de absorbancia celular generada para cada experimento. El cambio en la cantidad de células de control desde el inicio hasta el final de un experimento se normalizó como el 100 %. Los cambios en las células tratadas se presentaron como un porcentaje respecto al control no tratado.

También se determinó la proliferación celular por inmunotinción de las células en portaobjetos de cámara con anticuerpo antígeno nuclear de célula proliferativa (PCNA) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) usando reactivos proporcionados en el kit de Vectastain ABC (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) y visualización de las células por microscopia de DIC. Se contaron al menos 500 células para determinar el porcentaje de células con núcleos PCNA positivos.

Análisis estadístico. Las significación estadística de la diferencia entre los valores medios se determinó usando análisis de ensayo *t* de Student para muestras relacionadas. El nivel de significación estadística se estableció $p < 0,05$. Los datos se analizaron como la media $\pm$ DT.

Ejemplo 2 - Resultados

Purificación de dos proteínas, p75 y p40, de sobrenadante de cultivo LGG. Los factores solubles recuperados de LGG-s y LGG-CM han demostrado regular las rutas de señalización y funciones biológicas del epitelio intestinal (Yan y Polk, 2002; Tao y col., 2006), pero las identidades de estos factores son desconocidas. Por lo tanto, los inventores persiguieron la caracterización de estos factores solubles para proporcionar información sobre los mecanismos moleculares de las acciones bacterianas probióticas sobre células huésped. Como primera etapa, se analizaron las proteínas en el sobrenadante de cultivo de cultivos de caldo LGG por SDS-PAGE y tinción con azul de

Coomassie. Dos de las proteínas más abundantes tenían masas moleculares de aproximadamente 75 kDa y 40 kDa. Para purificar estas proteínas de LGG-s se cargó el LGG-s filtrado en medio de intercambio iónico UNOsphere™ S con grupos funcionales cargados negativamente, y se eluyeron las proteínas unidas usando Tris 30 mM (pH 7,3) que contenía concentraciones progresivamente crecientes de NaCl de 0,1 M a 0,8 M. las proteínas eluidas se analizaron por SDS-PAGE para identificar las proteínas contenidas en cada fracción (datos no mostrados). La proteína de 75 kDa (p75) y la proteína de 40 kDa (p40) eluyeron de la resina de intercambio catiónico a concentraciones de NaCl de 0,25 M y 0,5 M respectivamente (FIG. 1A). El análisis de SDS-PAGE indicó que el procedimiento de cromatografía separaba satisfactoriamente p75 y p40.

Se generaron anticuerpos policlonales anti-p75 y anti-p40 usando p75 o p40 cromatográficamente purificados. El análisis de transferencia de Western indicó que el antisuero anti-p75 reconocía solamente p75 (FIG. 1B), y el antisuero anti-p40 reaccionaba tanto con p40 como con p75 (FIG. 1C). Los sueros preinmunes no reaccionaban con p75 o p40 (FIG. 1B-C). Los experimentos de experimentos de inmunotransferencia indicaron que la preparación de p75 purificada no estaba contaminada con p40, y la preparación de p40 purificada no estaba contaminada con p75 (FIG. 1B-C).

Caracterización de las proteínas p75 y p40. Como primera etapa en la caracterización de p75 y p40, se determinaron las secuencias N-terminales y las secuencias peptídicas internas de estas proteínas, como se describe en los procedimientos. Cuando se comparaban las secuencias en la base de datos de genoma microbiano del NCBI, las secuencias peptídicas de p75 y p40 estaban muy estrechamente relacionadas con dos proteínas codificadas de forma predicha por el genoma de *L. casei* 334 (números de acceso a NCBI GenBank COG0791 y COG3883, respectivamente). Se diseñaron múltiples cebadores oligonucleotídicos basados en la secuencias de los correspondientes genes de *L. casei* y secuencias de ADN flanqueantes en el genoma de *L. casei*, y estos cebadores se usaron para amplificar por PCR secuencias relacionadas del ADN genómico de LGG.

El análisis de secuencia de un conjunto de productos clonados de PCR reveló la presencia de una ORF de 1236 pb, que se había predicho que codificaba una proteína de 412 restos de aminoácido con una masa molecular calculada de 42 kDa (FIG. 1D). La secuencia de aminoácidos N-terminal determinada de forma experimental de p40 de LGG, así como una secuencia peptídica interna de p40, se identificaron dentro de la secuencia deducida de aminoácidos codificada por esta ORF (FIG. 1D). La secuencia deducida de aminoácidos de longitud completa de p40 era un 79 % idéntica a la secuencia de una proteína de 396 aminoácidos de función desconocida en *L. casei* 334 (NCBI GenBank COG3883).

El análisis de secuencia de otro conjunto de productos clonados de PCR reveló la presencia de una ORF parcial que era > 1488 pb de longitud; la ORF de longitud completa no se amplificó satisfactoriamente. La secuencia de aminoácidos N-terminal determinada de forma experimental de p75 y las secuencias peptídicas internas de p75 se identificaron dentro de la secuencia deducida de aminoácidos codificada por esta ORF parcial (FIG. 1D). La secuencia deducida de aminoácidos de p75 estaba muy estrechamente relacionada con una hidrolasa asociada a pared celular de 493 aminoácidos de *L. casei* 334 (NCBI GenBank COG0791), y mostraba un 70 % y un 93 % de identidad con dos regiones diferentes de esta proteína de *L. casei* 334. La masa molecular predicha de la hidrolasa asociada a pared celular de longitud completa de *L. casei* 334 (49 kDa) difiere sustancialmente de la masa molecular de la proteína p75 de LGG.

Un análisis de las secuencias génicas de p40 y p75 de LGG y las secuencias de aminoácidos N-terminales determinadas de forma experimental de las proteínas codificadas indica que ambos genes codifican proteínas con secuencias señal N-terminales. La presencia de secuencias señal es coherente con la hipótesis de que p40 y p75 se secretan de forma activa en el sobrenadante de cultivo por LGG. La secuencia génica de p40 y la secuencia génica de p75 parcial no muestran relación significativa, y las secuencias de aminoácidos N-terminales determinadas de forma experimental de estas dos proteínas no están relacionadas. Por tanto, en base a los datos de secuencia disponibles, no existen evidencias que sugieran que p40 es un producto de degradación de p75. Sin embargo, es posible que pudiera haber una similitud de secuencia entre p40 y la parte C-terminal no caracterizada de p75.

p75 y p40 estimulan la activación de Akt en células del epitelio intestinal. Como los inventores han informado de que factores recuperados de LGG-s estimulan la activación de Akt (Yan y Polk, 2002), primero determinaron el efecto de p75 y p40 sobre esta ruta de transducción de señales. Las células se trataron con diversas concentraciones de p75 y p40 y se determinó la activación de Akt por análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo contra Akt fosforilado. Los inventores descubrieron que p75 a 10-1000 ng/ml y p40 a 1-100 ng/ml estimulaban la activación de Akt de un modo dependiente de la concentración en células epiteliales de colon de ratón o humano (FIG. 2A). Se eligieron p75 a 100 ng/ml y p40 a 10 ng/ml para experimentos posteriores en este trabajo porque estas son las concentraciones mínimas para inducir activación detectable de Akt. Como controles, los inventores ensayaron la fracción de flujo continuo de la columna de intercambio iónico y la fracción eluida de la columna con NaCl 0,1 M; ninguna de estas preparaciones contenía p75 o p40, y ninguna de estas preparaciones activó Akt (datos no mostrados). Como con LGG-s, la activación de Akt por p75 o p40 fue dependiente de PI3K porque los inhibidores de PI3K, LY294002 y Wortmanina (datos no mostrados) bloqueaban la activación por p75 y p40 de Akt (FIG. 2B). Como los inventores han informado previamente de que LGG, pero no LGG-CM inhibe la activación estimulada por TNF de p38 (Yan y Polk, 2002), ensayaron si las proteínas purificadas de LGG-s modulan este ruta de señalización. De forma similar a LGG-CM, p75 y p40 no mostraron efectos sobre la activación por TNF

de p38 (FIG. 2D). Además, p75 y p40 tampoco fueron capaces de inducir la activación de ERK1/2 o p38 o la degradación de IκBα (tratamientos de 15 min a 4 horas, los datos de tratamiento de 2 horas se muestran en la FIG. 2D), o de inhibir los efectos de TNF sobre estas rutas (FIG. 2D). Por lo tanto, p75 y p40 purificados son selectivos en su actividad para regular la transducción de señales en células del epitelio intestinal.

p75 y p40 inhiben la apoptosis de células del epitelio intestinal y las lesiones de cultivo orgánico inducidas por TNF. Para determinar los papeles biológicos de proteínas purificadas de LGG-s, los inventores a continuación evaluaron los efectos de p75 y p40 sobre la apoptosis inducida por citoquinas en células del epitelio intestinal. Los inventores detectaron apoptosis de células del epitelio intestinal y la distinguieron de necrosis usando tres procedimientos diferentes. Los ensayos TUNEL e ISOL miden la apoptosis por marcaje específico de ADN genómico fragmentado con desoxinucleotidiltransferasa terminal o ADN ligasa T4, respectivamente. La tinción con Anexina V detecta apoptosis basada en Anexina V conjugada a FITC que se une específicamente a fosfatidilserina una vez expuesta a la capa exterior de la membrana plasmática durante el proceso apoptótico (van Engeland y col., 1998).

La apoptosis inducida por TNF detectada por ensayo TUNEL en células KSR^{-/-}MCE, una línea celular de colon de ratón nula para la expresión de KSR que experimenta apoptosis después de tratamiento con TNF (Yan y col., 2004), se inhibió por p75 o p40 (FIG. 3A-B). Como se esperaba, también se inhibió la apoptosis inducida por TNF por cocultivo de LGG (Yan y Polk, 2002). Estos resultados se confirmaron en células HT29, una línea celular de intestino humano por tinción con Anexina V-FITC. La combinación de "cóctel de citoquinas" de TNF interleuquina (IL)-1α, e IFN-γ indujo apoptosis en células HT29 que se revirtió por tratamiento con p75 o p40 (FIG. 3C-D).

Para determinar el potencial de p75 y p40 de regular la homeostasis epitelial del colon, los inventores realizaron cultivo orgánico de colon y observaron los efectos directos de p75 y p40 sobre el epitelio de colon *ex vivo* como se detalla en procedimientos. Secciones histológicas preparadas para evaluación de lesiones mostraron que TNF inducía necrosis masiva de la mucosa y alteración de la integridad epitelial en explantes de colon. El cocultivo con p75, p40 y LGG con TNF restauró la integridad del epitelio del colon y la estructura de criptas de las criptas del colon (FIG. 4).

El cocultivo de explantes de tejido de colon con TNF indujo apoptosis epitelial del colon conteniendo el 75 % de las criptas más de 10 células apoptóticas. Este efecto se disminuyó en 3 veces por cotratamiento con p75 o p40 ($p < 0,005$, FIG. 5A-B). Como la caspasa 3 es un regulador principal del programa apoptótico, y la activación de Akt dependiente de PI3K ha demostrado evitar la activación de caspasa 3 inducida por TNF (Trencia y col., 2003), los inventores determinaron el efecto de p75 y p40 sobre la actividad caspasa 3 usando inmunotinción con un anticuerpo anti-caspasa 3 activa. La activación de caspasa 3 estimulada por TNF en células del epitelio intestinal, se inhibió significativamente por cocultivo con p75 o p40 (FIG. 5C-D).

Por tanto, en líneas celulares de epitelio intestinal de ratón y humano y explantes cultivados de colon de ratón usando tres ensayos apoptóticos diferentes, tanto p75 como p40 ejercen efectos inhibidores significativos sobre la apoptosis inducida por TNF. Estos efectos pueden estar implicados en papeles protectores sobre lesiones epiteliales del intestino inducidas por TNF.

p75 y p40 estimulan el crecimiento de células del epitelio intestinal. El equilibrio homeostático entre la proliferación y la apoptosis regula la morfología y función normal del epitelio gastrointestinal. Las bacterias probióticas han demostrado potenciar la proliferación de células del epitelio intestinal (Ichikawa y col., 1999). Además, se ha informado de que PI3K y Akt desempeñan un papel crítico en la regulación de esta respuesta proliferativa en células del epitelio intestinal (Sheng y col., 2003). Por lo tanto, los inventores evaluaron los efectos de p75 y p40 sobre la proliferación celular usando un ensayo de proliferación basado en MTS. Tanto p75 como p40 promovieron el crecimiento de células YAMC, que se inhibía por el inhibidor de PI3K, LY294002, pero no por el inhibidor de MEK, PD98059 (FIG. 6A). Para caracterizar adicionalmente los efectos de p75 y p40 sobre la proliferación celular del intestino, se usó tinción PCNA para detectar núcleos proliferativos. p75 y p40 potenciaron la cantidad de núcleos PCNA positivos (FIG. 6B-C). Estos resultados sugieren que p75 y p40 ayudan a restaurar la integridad del epitelio intestinal después de lesión inducida por TNF a través no solamente de la prevención de la apoptosis, sino también de la potenciación de la proliferación.

La inmunorreducción de p75 y p40 de LGG-CM bloquea los efectos biológicos de LGG-CM sobre células del epitelio intestinal. Para ensayar por otro enfoque si p75 y p40 son necesarios para los efectos reguladores de LGG-CM sobre las células de epitelio intestinal, se usaron anticuerpos contra p75 y p40 para inmunoprecipitación secuencial para inmunorreducir tanto p75 como p40 de LGG-CM. La inmunoprecipitación con estos dos anticuerpos, pero no los sueros preinmunes, eliminaron de forma eficaz p75 y p40 de LGG-CM (FIG. 7A). Estas fracciones de LGG-CM inmunorreducidas se usaron para tratar células o explantes de cultivo de colon. La inmunorreducción de p75 y p40 de LGG-CM atenuó la activación de Akt (FIG. 7B). Además, LGG-CM, pero no LGG-CM inmunorreducido, prevenía las lesiones ulcerosas inducidas por TNF, incluyendo necrosis de la mucosa y alteración de la integridad epitelial (FIG. 7C) y la apoptosis epitelial en cultivos orgánicos de colon (FIG. 7D-E). La inmunorreducción individual de p75 o p40 atenuó parcialmente la activación de Akt y la respuesta antiapoptótica (datos no mostrados). Estos resultados indican que p75 y p40 son necesarios para la regulación por LGG-CM de las células del epitelio intestinal y sugieren que pueden tener funciones redundantes.

Expresión específica de cepa de p75 y p40 por lactobacilos. Como los inventores han informado de que la regulación por lactobacilos probióticos de la supervivencia celular es específica de cepa (Yan y Polk, 2002), los inventores a continuación investigaron si la expresión de proteínas p75 y p40 solubles también era específica de cepa. Para abordar esta cuestión, estudiaron otras tres cepas de *Lactobacillus*, *Lactobacillus casei* 334, *Lactobacillus casei* 393, y *Lactobacillus acidophilus*, que se sabe que regulan la función intestinal (Resta-Lenert y Barrett, 2006; Tien y col., 2006) o la proliferación de linfocitos y la inmunidad (Gill y col., 2000). Se separaron proteínas derivadas de medios condicionados de 10^5 de estas cepas respectivas de *Lactobacillus* por SDS-PAGE (FIG. 8A). Antiseros p75 y p40 reconocieron proteínas de tamaño similar en sobrenadante de cultivo de *L. casei* 393-CM, pero no se detectaron proteínas inmunorreactivas en sobrenadante de cultivo de *L. acidophilus*-CM (FIG. 8B). El antisuero p40 reconoció una proteína de 38 kDa producida por *L. casei* 334-CM (FIG. 8B), que es coherente con la relación entre p40 de LGG y una proteína de función desconocida codificada por *L. casei* (NCBI GenBank COG3883). Fue detectable una débil reactividad del antisuero p75 con una proteína de *L. casei* de 75 kDa solamente si se sobreexponían las películas (datos no mostrados).

Para investigar los efectos de factores solubles producidos por estas especies de *Lactobacillus* sobre células epiteliales, se cocultivaron bacterias con las células epiteliales pero se separaron físicamente por un filtro (0,2 μ M), de modo que cualquier efecto observado estuviera mediado por factores solubles. Aunque todas las cepas estimularon la activación de Akt e inhibieron la apoptosis inducida por citoquinas cuando estaban en contacto directo con células epiteliales, los sobrenadantes de LGG, *L. casei* 334, y *L. casei* 339, pero no *L. acidophilus* promovieron la activación de Akt (FIG. 8C) y evitaron la apoptosis inducida por TNF (FIG. 8D). La producción específica de cepa de proteínas p75 y p40 solubles y la correlación entre la expresión de estas proteínas y los fenotipos observables proporciona evidencias adicionales de que estos componentes bacterianos pueden promover la supervivencia celular del epitelio intestinal e inhibir la apoptosis inducida por citoquinas.

p75 y p40 estimulan la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que regula Akt en células del epitelio intestinal. La señalización del receptor de EGF es un regulador corriente arriba conocido para la activación de PI3K que conduce a activación de Akt. Por lo tanto, los inventores ensayaron la necesidad del receptor de EGF en la activación por p75 y p40 de Akt. Descubrieron que p75 y p40 estimulan la activación del receptor de EGF en células de colon de ratón adulto joven (YAMC), que se inhibe por el inhibidor de tirosina quinasa del receptor de EGF, AG1478 (FIG. 9). Además, p75 y p40 no lograron activar Akt en células de epitelio de colon de ratón (MCE) knock out para el receptor de EGF (EGFR^{-/-}) (FIG. 10A), que se rescata por el receptor de EGF de tipo silvestre (wt), pero no reexpresión del receptor de EGF de quinasa inactiva (ki) en células MCE (FIG. 10B). Estos resultados indican que el receptor de EGF puede mediar la regulación por p75 y p40 de la activación de Akt en células del epitelio intestinal.

p40 previene y trata la colitis inducida por DSS de un modo dependiente de EGFR. Como el modelo de ratón de DSS bien caracterizado de colitis aguda está caracterizado por producción aumentada de citoquinas inflamatorias y apoptosis de células epiteliales, los inventores investigaron los efectos preventivos y terapéuticos de p40 sobre lesión epitelial de colon inducida por DSS y colitis *in vivo*.

Para evaluar la capacidad de p40 de prevenir la colitis, se administró p40 al inicio del tratamiento con DSS hasta que se sacrificaron los ratones. El tratamiento con DSS durante 4 días o 7 días indujo lesión aguda y colitis con ulceración masiva de colon, daño de las criptas, e inflamación grave. Estas anomalías se redujeron por cotratamiento con perlas que contenían p40 en ratones wt, pero no en ratones EGFRwa2 (FIG. 16A). Se valoró la lesión e inflamación del epitelio del colon por un patólogo ciego al tratamiento. La administración de DSS a ratones wt indujo colitis grave (valores $7,6 \pm 1,6$ y $14,3 \pm 2,0$, después de 4 y 7 días de tratamiento con DSS, respectivamente). El tratamiento con p40 disminuyó significativamente la lesión y la inflamación (valores $6,1 \pm 1,1$, $p < 0,05$, y $11,1 \pm 1,7$, $p < 0,01$, después de 4 y 7 días de tratamiento con DSS respectivamente). La administración de perlas solamente (sin p40) no tuvo efecto sobre la colitis inducida por DSS (valores $8,3 \pm 1,4$ y $13,4 \pm 2,1$, después de 4 y 7 días de tratamiento con DSS) (FIG. 16B). En contraste con lo que se observó en ratones wt, el tratamiento con perlas que contenían p40 no mejoró los valores de lesión o inflamación en ratones EGFRwa2 con un EGFR deficiente en quinasa (FIG. B).

Para evaluar la capacidad de p40 de mejorar colitis establecida, se trataron ratones con DSS durante 4 días para inducir colitis y después se administró p40 mediante sonda nasogástrica durante los siguientes 3 días antes de sacrificar los ratones. Para comparar la eficacia relativa de p40 con terapias conocidas para colitis, los ratones se trataron con mesalamina o hidrocortisona durante 3 días después de tratamiento con DSS. La lesión e inflamación inducidas por DSS (valor $9,7 \pm 2,1$) se disminuyó significativamente por tratamiento con p40 (valor $6,7 \pm 2,7$, $p < 0,05$) en ratones wt (FIG. 16C). En ratones EGFRwa2, p40 no logró reducir la inflamación inducida por DSS. Además, el tratamiento con p40 redujo significativamente el acortamiento de colon inducido por DSS en ratones wt, pero no en EGFRwa2 (FIG. 16D). Se redujo la colitis inducida por DSS por tratamiento con mesalamina (valor $9,2 \pm 1,5$) e hidrocortisona (valor $8,3 \pm 3,8$) (FIG. 16C). Sin embargo, la mesalamina e hidrocortisona produjeron una pequeña disminución en la lesión e inflamación en ratones tratados con DSS, y los resultados no fueron estadísticamente significativos.

También se ensayaron los efectos de p40 sobre colitis en el modelo de ratón de colitis inducida por oxazolona dirigida por Th-2. Similar a los resultados en el modelo de DSS, los inventores descubrieron que p40 reducía

significativamente la colitis inducida por oxazolona (datos no mostrados).

Estos datos sugieren que p40 ejerce efectos tanto preventivos como terapéuticos sobre la lesión celular del epitelio intestinal asociada con colitis de un modo dependiente de EGFR.

p40 regula la integridad y permeabilidad de la barrera intestinal. Los inventores también ensayaron el efecto de p40 sobre la alteración inducida por TNF sobre la función de barrera en explantes de colon por inmunotinción para la proteína de unión ocluyente, ZO-1. El tratamiento con TNF indujo redistribución de esta proteína desde los complejos de unión ocluyente apical hasta el compartimento citoplasmático de células epiteliales de colon. Esta redistribución se evitó por co-tratamiento con p40 en ratones wt, pero no en ratones EGFRwa5 (FIG. 17F).

Para caracterizar adicionalmente los efectos de p40 sobre la alteración inducida por DSS de la integridad intestinal, se realizó un ensayo de permeabilidad *in vivo* para ensayar la función de barrera intestinal. Se encontró función de barrera alterada, determinada por aumento de FITC-dextrano en suero, en ratones wt tratados con DSS y también ratones EGFRwa2. El tratamiento con p40 evitó los cambios inducidos por DSS en la permeabilidad del colon en ratones wt, pero no en ratones EGFRwa2 (FIG. 18A). Como marcador de estructura de unión ocluyente, los inventores determinaron la distribución de una proteína de unión ocluyente, ZO-1, usando inmunotinción. La localización errónea inducida por DSS de ZO-1 en células epiteliales de colon se evitó por tratamiento con p40 en ratones wt, pero no en ratones EGFRwa2 (FIG. 18B). También descubrieron que p40 reducía la apoptosis celular del epitelio intestinal inducida por DSS y la alteración de la integridad intestinal cuando se administraba p40 como tratamiento para colitis en ratones wt, pero no en EGFRwa2 (datos no mostrados).

Ejemplo 3 - Materiales y procedimientos

Los inventores generaron una proteína de longitud completa p40 (FL) marcada con His y un péptido p40 de 1-60 aa N-terminal (p40 1-60 aa). Se usaron p40-FL (10 ng/ml) y p40 1-60 aa (10 ng/ml) para tratar células HT29, una línea celular de carcinoma epitelial de colon humano, durante 1 hora. Se detectó activación de EGFR y Akt por análisis de transferencia de Western de lisados celulares totales usando anticuerpos fosfo-específicos contra EGFR-Tyr1068 y Akt-Ser473 (P-Akt), respectivamente (FIG. 11A). Un fragmento que carecía del líder (p40 29-60) y fragmentos más grandes (1-180 y 181-412).

Se trataron células HT29 con un cóctel de citoquinas que contenía TNF (100 ng/ml), IL-1 α (10 ng/ml) y γ -IFN (100 ng/ml) en presencia o ausencia de un inhibidor de quinasa de EGFR (AG1478, 100 nM) durante 16 horas, con o sin pretratamiento de 1 hora de p40-FL (10 ng/ml) y p40 1-60 aa (10 ng/ml). Se mantuvieron p40-FL y p40 1-60 aa durante el curso completo del tratamiento con citoquinas. Se ensayó la apoptosis en células usando tinción con Anexina V seguida por citometría de flujo (FIG. 11B).

Ejemplo 4 - Resultados

p40 1-60 aa estimuló la activación de EGFR y Akt en células HT-29 al mismo nivel que el inducido por p40-FL. La apoptosis de células HT-29 inducida por cóctel de citoquinas se disminuyó en 3 veces por p40 1-60 aa, que se bloqueaba por AG1478. Estos datos sugieren que el dominio o dominios funcionales de p40 están dentro de los 1-60 aa N-terminales, e indican que dicho péptido es tan potente como p40-FL para regular la señalización y respuestas celulares en células de epitelio intestinal.

Se produjo proteína p40 marcada con His recombinante de acuerdo con el procedimiento mostrado en la FIG. 12. Se eluyeron fracciones de proteína de columna Ni-MAC y se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron usando anticuerpos anti-p40 y anti-His. Usando la parte de 1-180 aa N-terminal 1-180 de p40, los inventores demostraron la activación del receptor de EGF (EGFR) y Akt en células de epitelio intestinal de ratón (FIG. 13). Los 1-180 aa N-terminales de p40 también evitan la apoptosis inducida por citoquinas en células del epitelio intestinal (FIG. 14), y mejora la colitis aguda inducida por DSS en ratones (FIG. 15A-B).

Es importante observar que los inventores han identificado péptidos particulares de p40 que retienen la eficacia de p40. El uso de otras regiones de p40 no retuvo este efecto y por tanto no son capaces de conseguir los cambios en la salud observados en esta patente. Por ejemplo, los 181-412 aa C-terminales de p40 no mostraron la capacidad de activar fuertemente EGFR o Akt al mismo nivel que p40 nativo (FIG. 13).

Todas las composiciones, usos y procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden prepararse y ejecutarse sin experimentación excesiva a luz de la presente divulgación.

Patente de Estados Unidos 4.554.101
 Patente de Estados Unidos 4.684.611
 Patente de Estados Unidos 4.797.368
 Patente de Estados Unidos 4.879.236
 Patente de Estados Unidos 4.952.500
 Patente de Estados Unidos 5.139.941
 Patente de Estados Unidos 5.302.523
 Patente de Estados Unidos 5.322.783

Patente de Estados Unidos 5.384.253
 Patente de Estados Unidos 5.440.013
 Patente de Estados Unidos 5.443.826
 Patente de Estados Unidos 5.446.128
 5 Patente de Estados Unidos 5.464.765
 Patente de Estados Unidos 5.475.085
 Patente de Estados Unidos 5.538.877
 Patente de Estados Unidos 5.538.880
 Patente de Estados Unidos 5.550.318
 10 Patente de Estados Unidos 5.563.055
 Patente de Estados Unidos 5.580.859
 Patente de Estados Unidos 5.589.466
 Patente de Estados Unidos 5.591.616
 Patente de Estados Unidos 5.599.795
 15 Patente de Estados Unidos 5.610.042
 Patente de Estados Unidos 5.618.914
 Patente de Estados Unidos 5.656.610
 Patente de Estados Unidos 5.670.155
 Patente de Estados Unidos 5.672.681
 20 Patente de Estados Unidos 5.674.976
 Patente de Estados Unidos 5.702.932
 Patente de Estados Unidos 5.710.245
 Patente de Estados Unidos 5.736.524
 Patente de Estados Unidos 5.780.448
 25 Patente de Estados Unidos 5.789.215
 Patente de Estados Unidos 5.840.833
 Patente de Estados Unidos 5.859.184
 Patente de Estados Unidos 5.871.986
 Patente de Estados Unidos 5.929.237
 30 Patente de Estados Unidos 5.945.100
 Patente de Estados Unidos 5.981.274
 Patente de Estados Unidos 5.994.136
 Patente de Estados Unidos 5.994.624
 Patente de Estados Unidos 6.013.516
 35 Amaravadi y Thompson, J Clin. Invest., 115:2618-2624,2005.
 Apostolou y col., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 31:35-39, 2001.
 Ausubel y col., En: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994.
 Baichwal y Sugden, En: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), Plenum Press, NY, 117-148, 1986.
 Barany y Merrifield, En: The Peptides, Gross and Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.
 40 Bates, Mol. Biotechnol., 2(2):135-145, 1994.
 Battraw y Hall, Theor. App. Genet., 82(2):161-168, 1991.
 Besnard y col., Besnard y col., Gut., 43(5):634-638, 1998.
 Bhattacharjee y col., J. Plant Bioch. Biotech., 6(2):69-73, 1997.
 Blomer y col., J. Virol., 71(9):6641-6649, 1997.
 45 Borody y col., J. Clin. Gastroenterol., 37:42-47, 2003.
 Botoman y col., Am. Fam. Physician, 57(1):57-68, 1998.
 Bousvaros y col., Inflamm. Bowel Dis., 11:833-839, 2005.
 Brynskov y col., N. Engl. J. Med., 321(13):845-850, 1989.
 Carbonelli y col., FEMS Microbiol. Lett., 177(1):75-82, 1999.
 50 Chandler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(8):3596-601, 1997.
 Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987.
 Christou y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(12):3962-3966, 1987.
 Cocea, Biotechniques, 23(5):814-816, 1997.
 Cotten y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(13):6094-6098, 1992.
 55 Coupar y col., Gene, 68:1-10, 1988.
 Curiel, Nat. Immun., 13(2-3):141-164, 1994.
 D'Halluin y col., Plant Cell, 4(12):1495-1505, 1992.
 Dieleman y col., Gut., 52:370-376, 2003.
 Dionne y col., Clin. Exp. Immunol., 112(3):435-442, 1998.
 60 Dotan y col., Curr. Opin. Gastroenterol., 21:426-430, 2005.
 El-Assal y Besner, Gastroenterology, 129:609-625, 2005. Documento EPO 0273085
 Fechheimer y col., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
 Fellerman y col., Am. J. Gastroenterol., 93(10):1860-1866, 1998.
 Fraley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.
 65 Friedmann, Science, 244:1275-1281, 1989.
 Funakoshi y col., Digestion, 59(1):73-78, 1998.

- Galley y Webster, Br. J Anaesth., 77:11-16, 1996.
- Ghosh y Bachhawat, En: Liver Disease, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu y col. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- Gill y col., Br. J Nutr., 83:167-176, 2000.
- 5 Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190, 1985.
- Graham y Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
- Grunhaus y Horwitz, Seminar in virology, 3:237-252, 1992.
- Hanada y col., Biochim. Biophys. Acta, 1697:3-16, 2004.
- Harland y Weintraub, J Cell Biol., 101(3):1094-1099, 1985.
- 10 He y col., Plant Cell Reports, 14 (2-3):192-196, 1994.
- Hoffenberg y col., J Pediatr., 134(4):447-452, 1999.
- Hollander y col., Ann. Intern. Med., 105:883-885, 1986.
- Hollander, Scand. J. Gastroenterol., 27:721-726, 1992.
- Hooper y col., Science, 291:881-884, 2001.
- 15 Horwich y col. J. Virol., 64:642-650, 1990.
- Hou y Lin, Plant Physiology, 111:166, 1996.
- Houghten y col., Infect. Immun., 48(3):735-740, 1985.
- Ichikawa y col., Dig. Dis. Sci., 44:2119-2123, 1999.
- Inouye y Inouye, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109, 1985.
- 20 Johannesson y col., J. Med. Chem., 42(22):4524-4537, 1999.
- Johnson y col., En: Biotechnology And Pharmacy, Pezzuto y col. (Eds.), Chapman and Hall, NY, 1993.
- Kaeppler y col., Plant Cell Reports, 9:415-418, 1990.
- Kaneda y col., Science, 243:375-378, 1989.
- Kato y col., J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
- 25 Kelleher y Vos, Biotechniques, 17(6):1110-7, 1994.
- Kelly y col., Nat. Immunol., 5:104-112, 2004.
- Klein y col., Nature, 327:70-73, 1987.
- Knodler y col., J. Biol Chem., 280:9058-9064, 2005.
- Kuboyama, Kurume Med. J., 45(1):33-37, 1998.
- 30 Land y col., Pediatrics, 115:178-181, 2005.
- Laughlin y col., J Virol., 60(2):515-524, 1986.
- Lazzeri, Methods Mol. Biol., 49:95-106, 1995.
- Lebkowski y col., Mol. Cell. Biol., 8(10):3988-3996, 1988.
- Lee y col., Environ. Mol. Mutagen., 13(1):54-59, 1989.
- 35 Leiper y col., Baillieres Clin. Gastroenterol., 12(1):179-199, 1998.
- Levenson y col., Hum. Gene Ther., 9(8):1233-1236, 1998.
- Lilly y Stillwell, Science, 147:747-748, 1965.
- Lugering y col., Ital. J. Gastroenterol. Hepatol., 30(3):338-344, 1998.
- Mack y col., Gut., 52:827-833, 2003.
- 40 Macpherson y Uhr, Science, 303:1662-1665, 2004.
- Makowiec y col., Z. Gastroenterol., 36(8):619-624, 1998.
- Maniatis, y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- Mann y col., Cell, 33:153-159, 1983.
- 45 Marini y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:8366-8371, 2003.
- Matsuura y col., Gastroenterology, 128:975-986, 2005.
- McAlindon y col., Gut., 42(2):214-219, 1998.
- McCole y col., Gastroenterology, 129:591-608, 2005.
- McLaughlin y col., J. Virol., 62(6):1963-1973, 1988.
- 50 Merrifield, Science, 232(4748):341-347, 1986.
- Miettinen y col., Infect. Immun., 64:5403-5405, 1996.
- Miller y col., Am. J. Clin. Oncol., 15(3):216-221, 1992.
- Mimura y col., Gut., 53:108-114, 2004.
- Murch, Nutrition, 14:780-783, 1998.
- 55 Muzyczka, Curr. Topics Microbial. Immunol., 158:97-129, 1992.
- Nabel y col., Science, 244(4910):1342-1344, 1989.
- Naldini y col., Science, 272(5259):263-267, 1996.
- Neish, Inflamm. Bowel Dis., 10:159-168, 2004.
- Nicolas y Rubinstein, En: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pág. 494-513, 1988.
- 60 Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.
- Nicolau y col., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
- Omirulleh y col., Plant Mol. Biol., 21(3):415-428, 1993.
- Otte y Podolsky, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 286:G613-26, 2004.
- 65 Paskind y col., Virology, 67:242-248, 1975.
- Solicitud PCT WO 9217598

- Solicitud PCT WO 94/09699
Solicitud PCT WO 95/06128
Perales y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4086-4090, 1994.
Potrykus y col., Mol. Gen. Genet., 199(2):169-177, 1985.
5 Potter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, 1984.
Reimund y col., Eur. J. Clin. Invest., 28(2):145-150, 1998.
Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
Resta-Lenert y Barrett, Gastroenterology, 130:731-746, 2006.
Resta-Lenert y Barrett, Gut., 52:988-997, 2003.
10 Rhodes y col., Methods Mol. Biol., 55:121-131, 1995.
Ridgeway, En: Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Rodriguez y col. (Eds.), Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.
Rippe, y col., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.
Rogler y Andus, World J. Surg., 22(4):382-389, 1998.
15 Roux y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9079-9083, 1989.
Ruemmele y col., Gastroenterol., 115(4):822-829, 1998.
Saiki y col., Scand. J. Gastroenterol., 33(6):616-622, 1998.
Sambrook y col., En: Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
20 Sartor, Am. J. Gastroenterol., 92(12):5S-11S, 1997.
Sartor, Gastroenterology, 126:1620-1633, 2004.
Sartor, En: Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management, Feldman y col. (Eds.), 7ª Ed., 1:21-51, Saunders, Filadelfia, 2002.
Schreiber, Neth. J. Med., 53(6):S24-31, 1998.
25 Schultz y col., BMC Gastroenterol., 4:5, 2004.
Sheng y col., Gut., 52:1472-1478, 2003.
Sinha y col., N. Engl. J. Med., 349:350-357, 2003.
Soderholm y col., Gastroenterol., 117:65-72, 1999.
Stack y col., Lancet., 349(9051):521-524, 1997.
30 Stewart y Young, En: Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chemical Co., 1984.
Tam y col., J. Am. Chem. Soc., 105:6442, 1983.
Tao y col., Am. J. Physiol. Cell Physiol., 290:C1018-1030, 2006.
Targan y col., N. Engl. J. Med., 337(15):1029-1035, 1997.
Temin, En: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
35 Tien y col., J. Immunol., 176:1228-1237, 2006.
Tratschin y col., Mol. Cell Biol., 4:2072-2081, 1984.
Trencia y col., Mol. Cell Biol., 23:4511-4521, 2003.
Tsukada y col., Plant Cell Physiol., 30(4):599-604, 1989.
Tur-Kaspa y col., Mol. Cell Biol., 6:716-718, 1986.
40 van Dulleman y col., Gastroenterol., 109(1):129-135, 1995.
van Engeland y col., Cytometry, 31:1-9, 1998.
van Hogezaand y Verspaget, Drugs, 56(3):299-305, 1998.
Vita y col., Biopolymers 47:93-100, 1998.
Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(9):3410-3414, 1990.
45 Weisshoff y col., Eur. J. Biochem., 259(3):776-788, 1999.
Wilson y col., Science, 244:1344-1346, 1989.
Wong y col., Gene, 10:87-94, 1980.
Wu y Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159-167, 1993.
Wu y Wu, Biochemistry, 27: 887-892, 1988.
50 Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987.
Xu y col., Science, 299:2074-2076, 2003.
Yan y Polk, Curr. Op. Gastroenterol., 20:565-571, 2004.
Yan y Polk, J. Biol. Chem., 277:50959-50965, 2002.
Yan y col., Cancer Res., 61:8668-8675, 2001.
55 Yan y col., Gastroent., 132(2):562-75, 2007.
Yan y col., J. Clin. Invest., 114:1272-1280, 2004.
Yang y Russell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4144-4148, 1990.
Zeissig y col., Gut., 53:1295-1302, 2004.
Zhang y col., J. Clin. Invest., 115:2855-2861, 2005.
60 Zhou y col., Nature, 361(6412):543-547, 1993.
Zufferey y col., Nat. Biotechnol., 15(9):871-875, 1997.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> POLK, D. BRENT YAN, FANG
65

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS QUE IMPLICAN APOPTOSIS DE CÉLULAS EPITELIALES

<130> VBLT:154WO

<140> DESCONOCIDO

<141> 28-04-2010

<150> 61/173.337

<151> 28-04-2009

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1239

<212> ADN

<213> *Lactobacillus acidophilus*

<400> 1

```

atgaaattca ataaagcaat gatcacgttg gttgctgcag ttaccttagc gggttctgtt      60
agcgccttaa caccggtttt cgctgacaca agtgccagca tcgcatctaa caagagcgaa      120
accaacgatt tattaaagca aatcgaagca gctaacactg aagtgatcaa cctcaacaaa      180
cagattgatg ctaagaatgg cgaaatcagt gacgccactg ccaagatcag tgcaacggat      240
gccaaagatcg catcggttag tggcgaaatc accgctgctc aaaagaacgt cgcagcccg      300
aagaacaact tgaaggatca attgatttcc cttcaaaaga aagccggcag ttcagttagc      360
ggcaatgtct atattgattt cgtgttgaac tcacaaagtc tatctgactt gattgcccg      420
accatgacag tcggcaagtt aagtcaagcc agcaaagacg ctttggtatgc ggtaaccgtc      480
gccaaagata agttagccgc tttgaagagt gaacaggaaa cggcacgtca gaccttggtt      540
tcgactaaag catctcttga aacgcaaaag tcacagctag agacccttca aaagaccgca      600
agcgataagc aagatgcttt gaacaaagaa attgctgac acaaagacga attggttgca      660
ctccaaagtc aatttgctca agaacaatca gaagcagcca aagcaacca ggctgccttg      720
aagacagcag ctgcatcaac tgcttcaagt tctaccagct caacttcaa taagagtgcc      780
aacagcagtg ttctttcgac tggtagctca tcaaccaaca cttcttccaa cagcggtgcc      840
tcactactg tgatcagcag caacactgct tcaggtagcg gcagccatgc tgattacagc      900
gggtcaggta acacttatcc ttggggtcag tgcacatggc acgttaagtc tgttgcttca      960
tgggcaggca atggctgggg caacggtgct gaatggggcg cttccgctgc agcagccggc     1020
ttcacggtta accacacccc ggcagcaggt tccatcatcg tcttcgctgc tgggtcaatct     1080
gttggcggcc aatggacagc tgatggctct tatggtcacg ttgcttatgt tcaatctggt     1140
tctggcgaca gcgttacgat cactcaaggc ggcatgggct tcagctcacc aaccggtcct     1200

aacacccaga ccatctctgg tgccagcagc tacgtttaa                                1239

```

<210> 2

<211> 412

<212> PRT

<213> *Lactobacillus acidophilus*

<400> 2

```

Met Lys Phe Asn Lys Ala Met Ile Thr Leu Val Ala Ala Val Thr Leu
 1           5           10           15

Ala Gly Ser Val Ser Ala Leu Thr Pro Val Phe Ala Asp Thr Ser Ala
 20           25           30

Ser Ile Ala Ser Asn Lys Ser Glu Thr Asn Asp Leu Leu Lys Gln Ile
 35           40           45

Glu Ala Ala Asn Thr Glu Val Ile Asn Leu Asn Lys Gln Ile Asp Ala
 50           55           60

Lys Asn Gly Glu Ile Ser Asp Ala Thr Ala Lys Ile Ser Ala Thr Asp
 65           70           75           80

Ala Lys Ile Ala Ser Leu Ser Gly Glu Ile Thr Ala Ala Gln Lys Asn
 85           90           95

Val Ala Ala Arg Lys Asn Asn Leu Lys Asp Gln Leu Ile Ser Leu Gln
 100          105          110

Lys Lys Ala Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Val Tyr Ile Asp Phe Val
 115          120          125

Leu Asn Ser Gln Ser Leu Ser Asp Leu Ile Ala Arg Thr Met Thr Val
 130          135          140

Gly Lys Leu Ser Gln Ala Ser Lys Asp Ala Leu Asp Ala Val Thr Val
 145          150          155          160

Ala Lys Asp Lys Leu Ala Ala Leu Lys Ser Glu Gln Glu Thr Ala Arg
 165          170          175

Gln Thr Leu Val Ser Thr Lys Ala Ser Leu Glu Thr Gln Lys Ser Gln
 180          185          190

Leu Glu Thr Leu Gln Lys Thr Ala Ser Asp Lys Gln Asp Ala Leu Asn
 195          200          205

Lys Glu Ile Ala Asp His Lys Asp Glu Leu Val Ala Leu Gln Ser Gln
 210          215          220

```

Phe Ala Gln Glu Gln Ser Glu Ala Ala Lys Ala Thr Gln Ala Ala Leu
 225 230 235 240

Lys Thr Ala Ala Ala Ser Thr Ala Ser Ser Ser Thr Ser Ser Thr Ser
 245 250 255

Asn Lys Ser Ala Asn Ser Ser Val Leu Ser Thr Gly Thr Ser Ser Thr
 260 265 270

Asn Thr Ser Ser Asn Ser Gly Ala Ser Ser Thr Val Ile Ser Ser Asn
 275 280 285

Thr Ala Ser Gly Ser Gly Ser His Ala Asp Tyr Ser Gly Ser Gly Asn
 290 295 300

Thr Tyr Pro Trp Gly Gln Cys Thr Trp Tyr Val Lys Ser Val Ala Ser
 305 310 315 320

Trp Ala Gly Asn Gly Trp Gly Asn Gly Ala Glu Trp Gly Ala Ser Ala
 325 330 335

Ala Ala Ala Gly Phe Thr Val Asn His Thr Pro Ala Ala Gly Ser Ile
 340 345 350

Ile Val Phe Ala Ala Gly Gln Ser Val Gly Gly Gln Trp Thr Ala Asp
 355 360 365

Gly Ser Tyr Gly His Val Ala Tyr Val Gln Ser Val Ser Gly Asp Ser
 370 375 380

Val Thr Ile Thr Gln Gly Gly Met Gly Phe Ser Ser Pro Thr Gly Pro
 385 390 395 400

Asn Thr Gln Thr Ile Ser Gly Ala Ser Ser Tyr Val
 405 410

<210> 3
 <211> 180
 <212> ADN
 <213> *Lactobacillus acidophilus*
 <400> 3

atgaaattca ataaagcaat gatcacgttg gttgctgcag ttaccttagc gggttctggt 60
 agcgccttaa caccggtttt cgctgacaca agtgccagca tcgcatctaa caagagcgaa 120
 accaacgatt tattaaagca aatcgaagca gctaacactg aagtgatcaa cctcaacaaa 180

<210> 4
 <211> 60

ES 2 568 938 T3

<212> PRT

<213> *Lactobacillus acidophilus*

<400> 4

5

Met Lys Phe Asn Lys Ala Met Ile Thr Leu Val Ala Ala Val Thr Leu
1 5 10 15

Ala Gly Ser Val Ser Ala Leu Thr Pro Val Phe Ala Asp Thr Ser Ala
20 25 30

Ser Ile Ala Ser Asn Lys Ser Glu Thr Asn Asp Leu Leu Lys Gln Ile
35 40 45

Glu Ala Ala Asn Thr Glu Val Ile Asn Leu Asn Lys
50 55 60

<210> 5

<211> 96

10

<212> ADN

<213> *Lactobacillus acidophilus*

<400> 5

acacaagtgc cagcatcgca tctaacaaga gcgaaaccaa cgatttatta aagcaaatcg 60

15

aagcagctaa cactgaagtg atcaacctca acaaac 96

<210> 6

<211> 32

20

<212> PRT

<213> *Lactobacillus acidophilus*

<400> 6

Asp Thr Ser Ala Ser Ile Ala Ser Asn Lys Ser Glu Thr Asn Asp Leu
1 5 10 15

Leu Lys Gln Ile Glu Ala Ala Asn Thr Glu Val Ile Asn Leu Asn Lys
20 25 30

25

<210> 7

<211> 540

<212> ADN

<213> *Lactobacillus acidophilus*

30

<400> 7

ES 2 568 938 T3

atgaaattca ataaagcaat gatcacgttg gttgctgcag ttaccttagc gggttctgtt	60
agcgccctaa caccggtttt cgctgacaca agtgccagca tcgcatctaa caagagcgaa	120
accaacgatt tattaagca aatcgaagca gctaactctg aagtgatcaa cctcaacaaa	180
cagattgatg ctaagaatgg cgaaatcagt gacgccactg ccaagatcag tgcaacggat	240
gccaagatcg catcggttgag tggcgaaatc accgctgctc aaaagaacgt cgcagcccg	300
aagaacaact tgaaggatca attgatttcc cttcaaaaga aagccggcag ttcagttagc	360
ggcaatgtct atattgattt cgtgttgaac tcacaaagtc tatctgactt gattgcccg	420
accatgacag tcggcaagtt aagtcaagcc agcaaagacg ctttggtatgc ggtaaccg	480
gccaagata agttagccgc tttgaagagt gaacaggaaa cggcacgtca gaccttggtt	540

<210> 8

<211> 180

<212> PRT

<213> *Lactobacillus acidophilus*

<400> 8

5

ES 2 568 938 T3

Met	Lys	Phe	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Thr	Leu	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Leu
1				5					10					15	
Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	Val	Phe	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala
			20					25					30		
Ser	Ile	Ala	Ser	Asn	Lys	Ser	Glu	Thr	Asn	Asp	Leu	Leu	Lys	Gln	Ile
		35					40					45			
Glu	Ala	Ala	Asn	Thr	Glu	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Lys	Gln	Ile	Asp	Ala
	50					55					60				
Lys	Asn	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Lys	Ile	Ser	Ala	Thr	Asp
65					70					75					80
Ala	Lys	Ile	Ala	Ser	Leu	Ser	Gly	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Lys	Asn
				85					90					95	
Val	Ala	Ala	Arg	Lys	Asn	Asn	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ile	Ser	Leu	Gln
			100					105						110	
Lys	Lys	Ala	Gly	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Asn	Val	Tyr	Ile	Asp	Phe	Val
		115					120					125			
Leu	Asn	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Ile	Ala	Arg	Thr	Met	Thr	Val
	130					135					140				
Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Leu	Asp	Ala	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Ala	Lys	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Lys	Ser	Glu	Gln	Glu	Thr	Ala	Arg
				165					170					175	
Gln	Thr	Leu	Val												
			180												

<210> 9
 <211> 484
 <212> ADN
 <213> *Lactobacillus acidophilus*
 <400> 9

ES 2 568 938 T3

```

tgtagcgcc ttaacaccgg ttttcgctga cacaagtgcc agcatcgcat ctaacaagag      60
cgaaaccaac gatttattaa agcaaatcga agcagctaac actgaagtga tcaacctcaa      120
caaacagatt gatgctaaga atggcgaaat cagtgcgcgc actgccaaga tcagtgcgac      180
ggatgccaaag atcgcatcgt tgagtggcga aatcacccgct gctcaaaaga acgtcgcagc      240
ccggaagaac aacttgaagg atcaattgat ttcccttcaa aagaaagccg gcagttcagt      300
tagcggcaat gtctatattg atttcgtggt gaactcacia agtctatctg acttgattgc      360
ccgtaccatg acagtcggca agttaagtca agccagcaaa gacgctttgg atgcggtaac      420
cgtcgccaaa gataagttag ccgctttgaa gagtgaacag gaaacggcac gtcagacctt      480
ggtt                                     484

```

<210> 10
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> *Lactobacillus acidophilus*
 <400> 10

```

Asp Thr Ser Ala Ser Ile Ala Ser Asn Lys Ser Glu Thr Asn Asp Leu
1          5          10          15

Leu Lys Gln Ile Glu Ala Ala Asn Thr Glu Val Ile Asn Leu Asn Lys
20          25          30

Gln Ile Asp Ala Lys Asn Gly Glu Ile Ser Asp Ala Thr Ala Lys Ile
35          40          45

Ser Ala Thr Asp Ala Lys Ile Ala Ser Leu Ser Gly Glu Ile Thr Ala
50          55          60

Ala Gln Lys Asn Val Ala Ala Arg Lys Asn Asn Leu Lys Asp Gln Leu
65          70          75          80

Ile Ser Leu Gln Lys Lys Ala Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Val Tyr
85          90          95

Ile Asp Phe Val Leu Asn Ser Gln Ser Leu Ser Asp Leu Ile Ala Arg
100         105         110

Thr Met Thr Val Gly Lys Leu Ser Gln Ala Ser Lys Asp Ala Leu Asp
115         120         125

Ala Val Thr Val Ala Lys Asp Lys Leu Ala Ala Leu Lys Ser Glu Gln
130         135         140

Glu Thr Ala Arg Gln Thr Leu Val
145         150

```

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de *Lactobacillus* que comprende un fragmento de p40, en el que el fragmento comprende la SEQ ID NO: 6, y en el que el péptido contiene no más de 100 aminoácidos de la molécula p40 definida por la SEQ ID NO: 2.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el fragmento de p40 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4.
- 5 3. El péptido de cualquier reivindicación precedente, que consiste en 32, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 aminoácidos.
4. El péptido de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho péptido comprende uno o más aminoácidos no naturales, uno o más D-aminoácidos, un dominio de direccionamiento o un dominio de estabilización.
- 10 5. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de *Lactobacillus* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 dispersado en un tampón, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. Un segmento de ácido nucleico aislado y purificado que codifica un péptido de *Lactobacillus* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. El segmento de ácido nucleico de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente un promotor que dirige la transcripción de dicho segmento de ácido nucleico.
- 15 8. El segmento de ácido nucleico de la reivindicación 7, en el que dicho segmento de ácido nucleico se obtiene de la SEQ ID NO: 1.
9. El segmento de ácido nucleico de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente un vector replicable, tal como un plásmido; o un vector vírico, por ejemplo un vector de baculovirus.
- 20 10. Una célula huésped que comprende un segmento de ácido nucleico aislado y purificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que opcionalmente la célula huésped es una célula bacteriana, tal como una célula de *Lactobacillus*, o una célula eucariota, tal como una célula de levadura o una célula de insecto.
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en la inhibición de la apoptosis de células epiteliales inducida por citoquinas y/o la promoción del crecimiento de células epiteliales en un sujeto.
- 25 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que el sujeto se trata adicionalmente con un agente seleccionado entre un agonista de EGFR, o un antibiótico.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que dicho sujeto es un ser humano, una rata, un ratón, una oveja, un perro, un gato, un conejo.
- 30 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que dicho sujeto padece (i) una infección gastrointestinal, tal como una infección gastrointestinal que comprende cólera, infección por rotavirus o infección por *E. coli* enterotoxigénica; o (ii) un trastorno gastrointestinal, tal como un trastorno gastrointestinal que comprende enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, enterocolitis necrotizante, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enteropatía por VIH, gastritis por *Helicobacter* o enteropatía/enteritis por AINE.
- 35 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que dicha célula epitelial está comprendida dentro de tejido cutáneo, tejido de la córnea, tejido pulmonar, un tejido inflamado, tejido cardíaco, músculo, una articulación, o tejido lesionado por citoquinas.
16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad gastrointestinal en un sujeto.
- 40 17. Una composición farmacéutica que comprende un segmento de ácido nucleico aislado y purificado de acuerdo con la reivindicación 6 dispersado en un tampón, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, estando situado dicho segmento de ácido nucleico bajo el control de un promotor, para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad gastrointestinal en un sujeto.

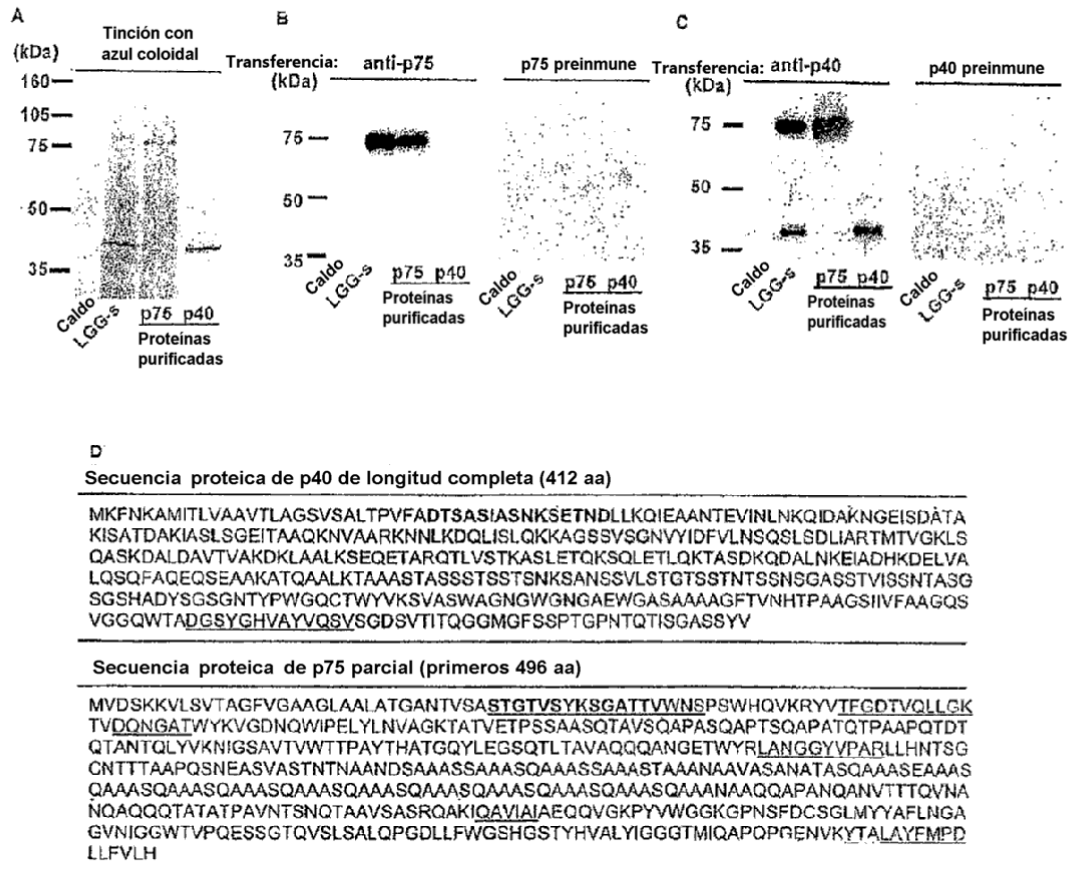


FIG. 1A-D

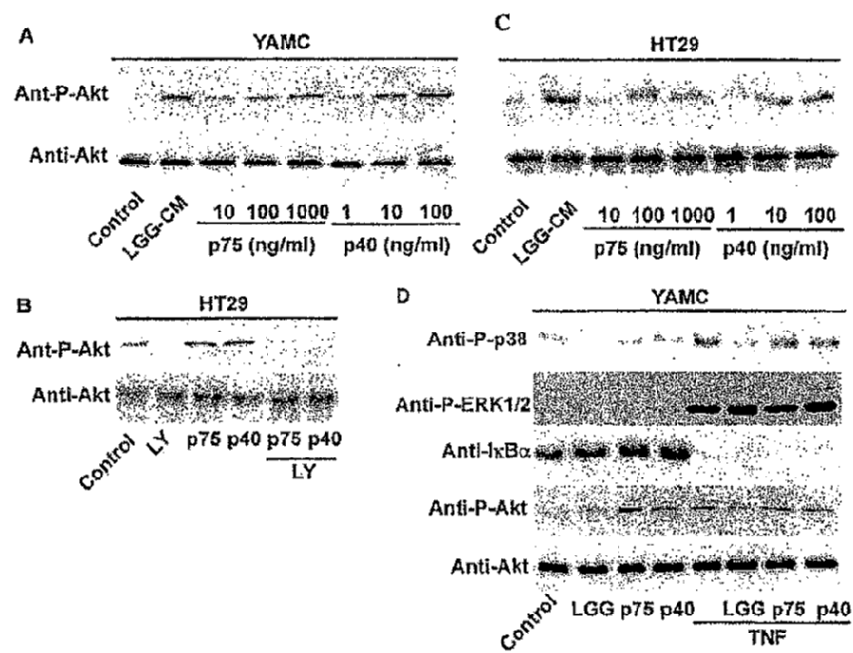


FIG. 2A-D

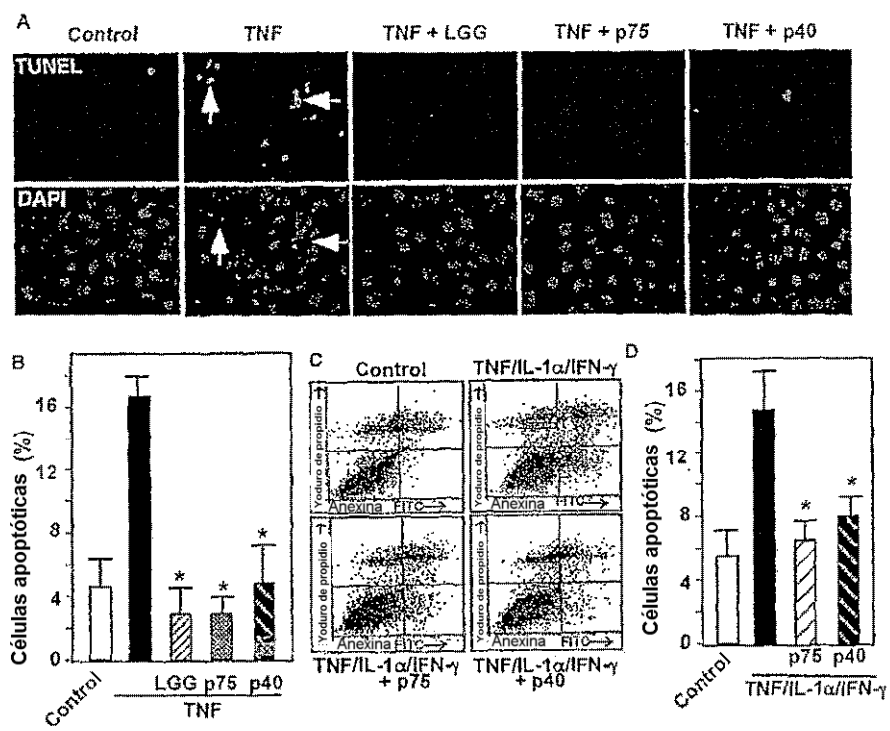


FIG. 3A-D

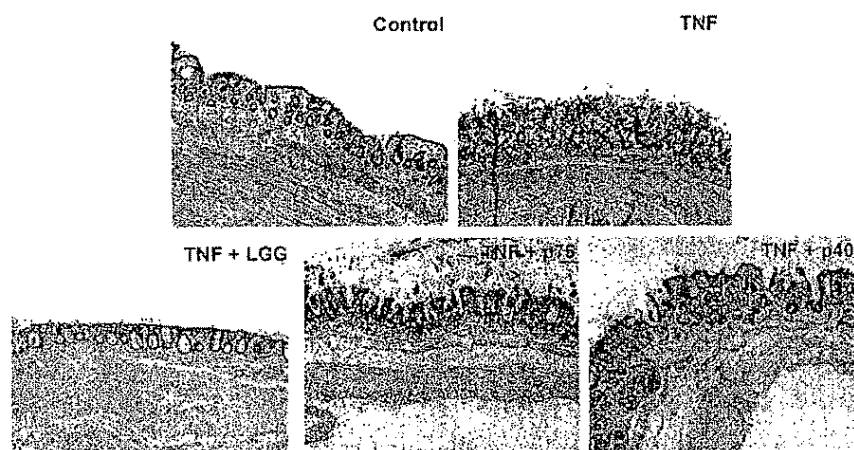


FIG. 4

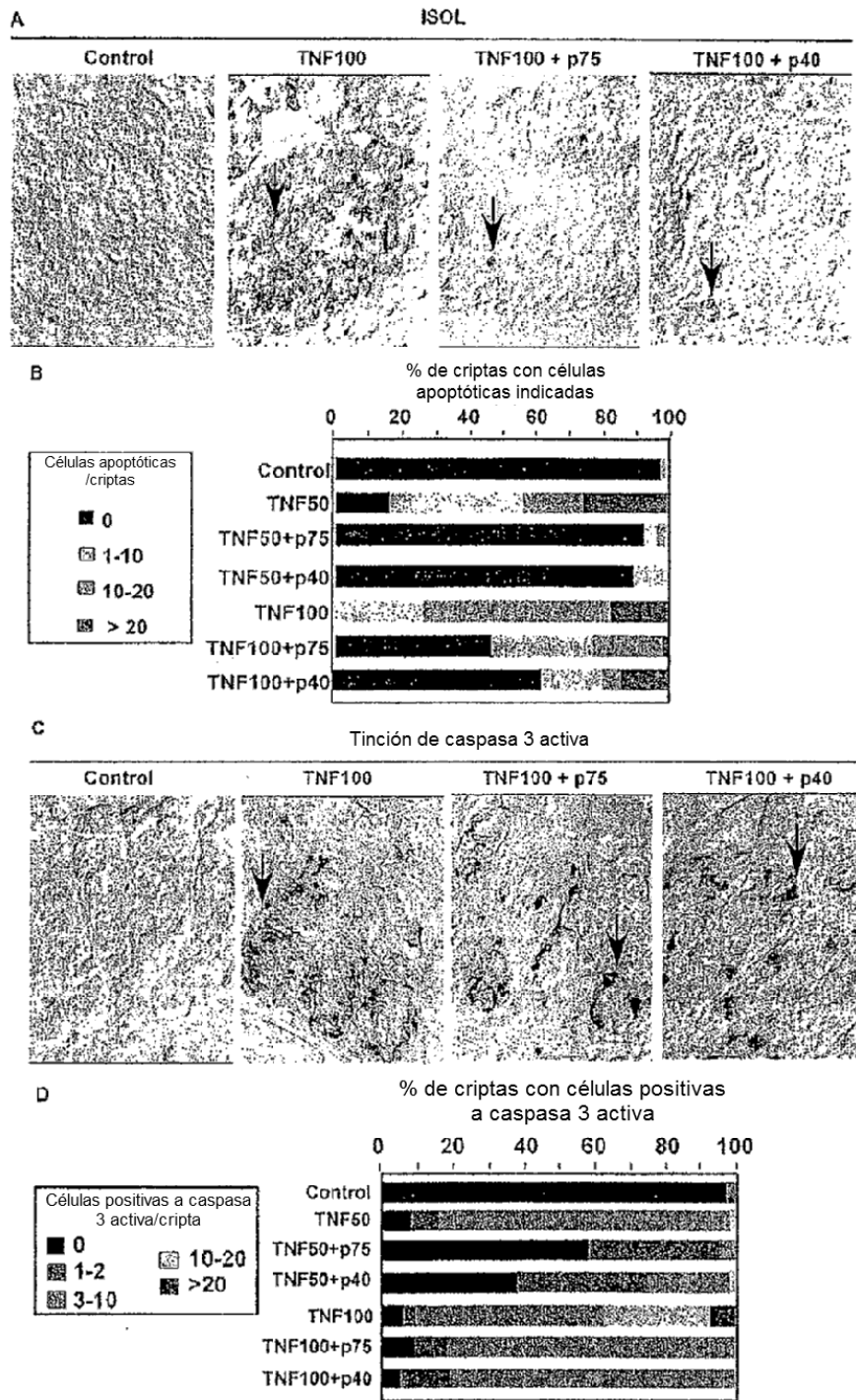


FIG. 5A-D

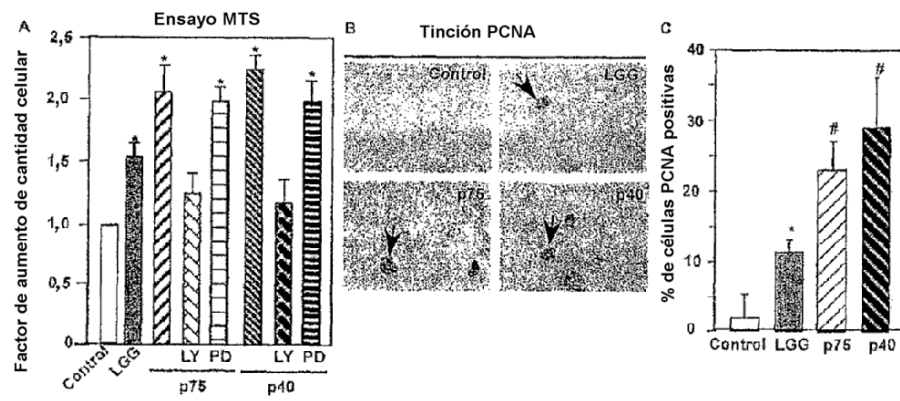


FIG. 6A-C

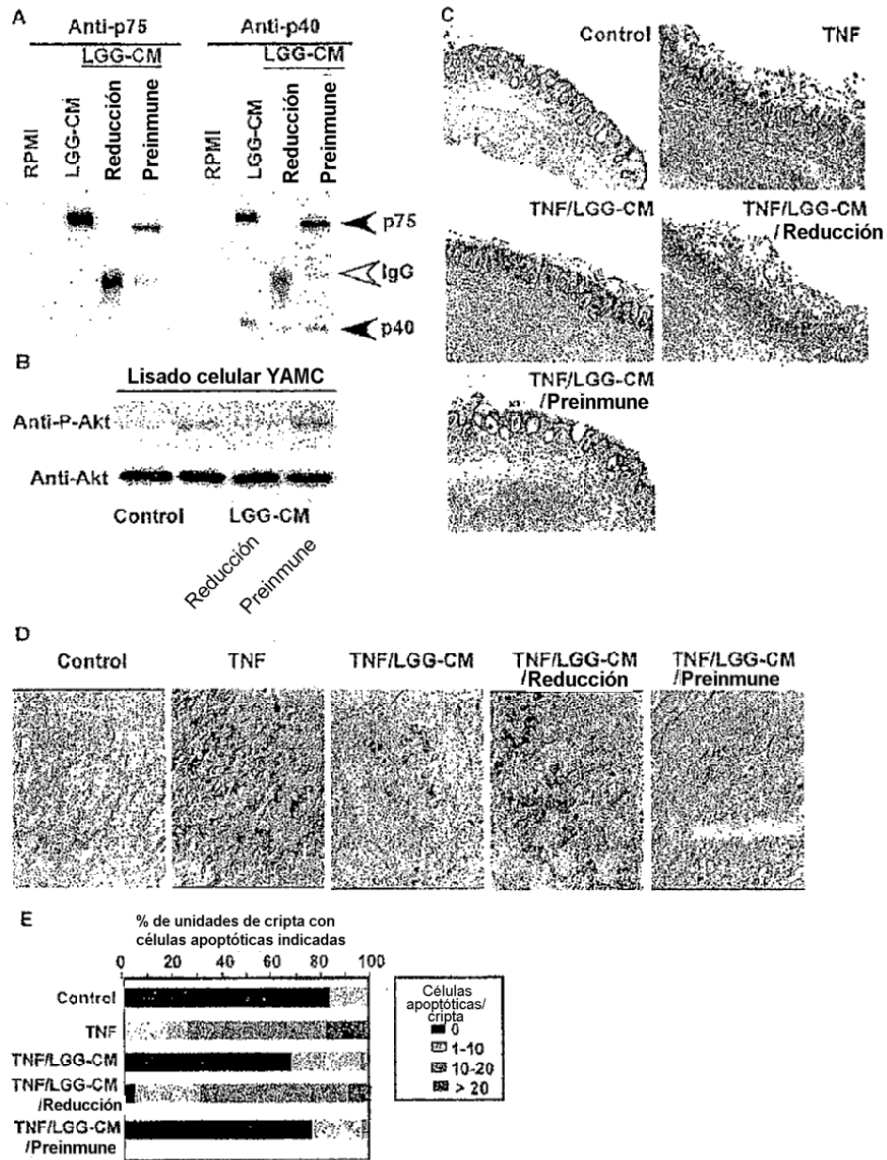


FIG. 7A-E

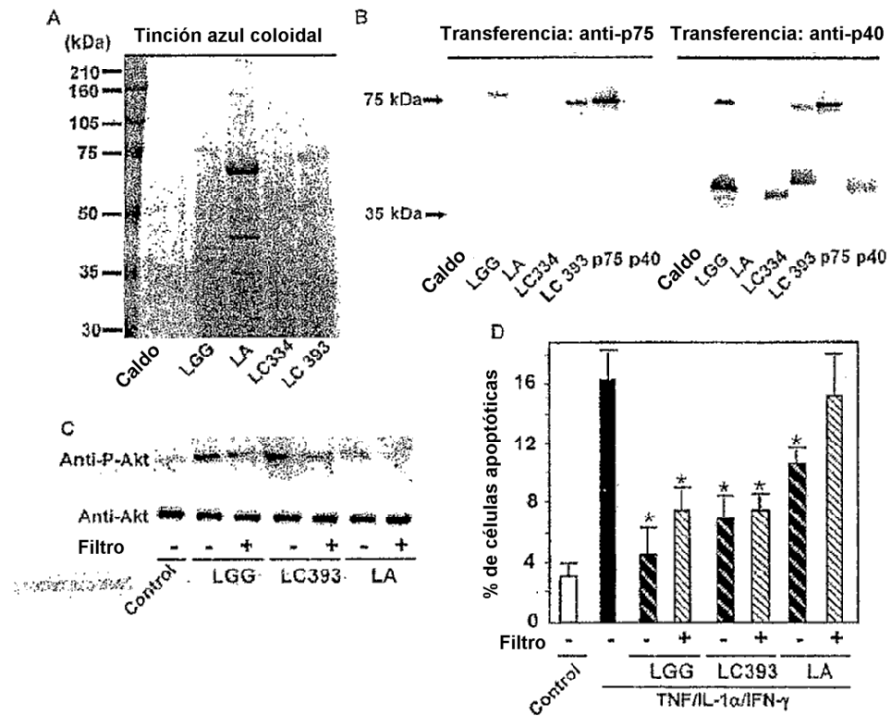


FIG. 8A-D

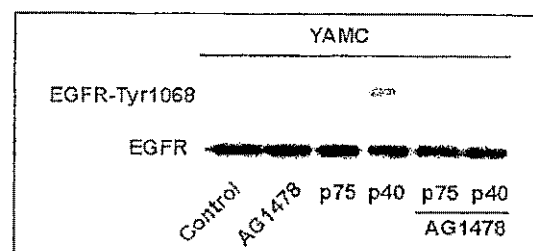


FIG. 9

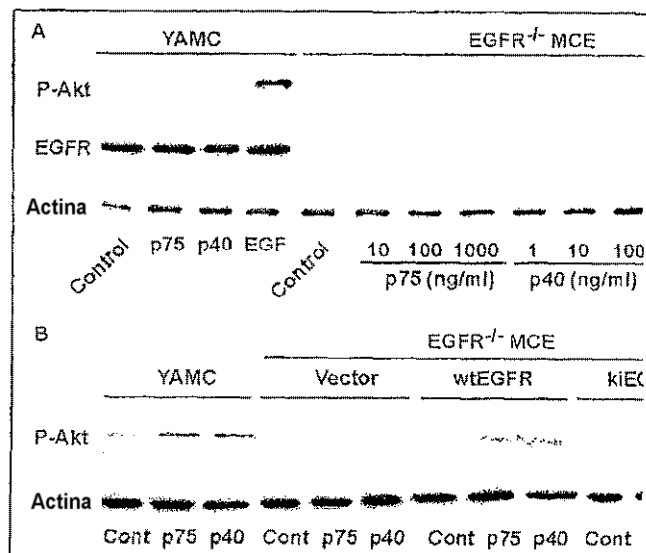


FIG. 10A-B

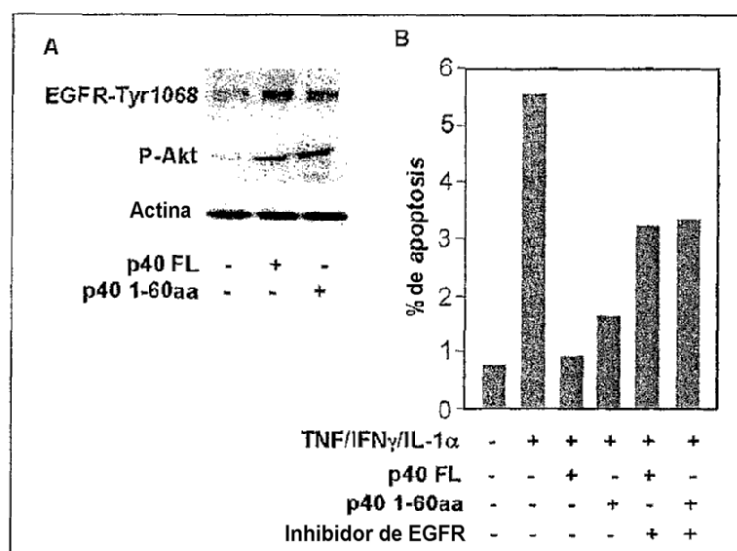


FIG. 11A-B

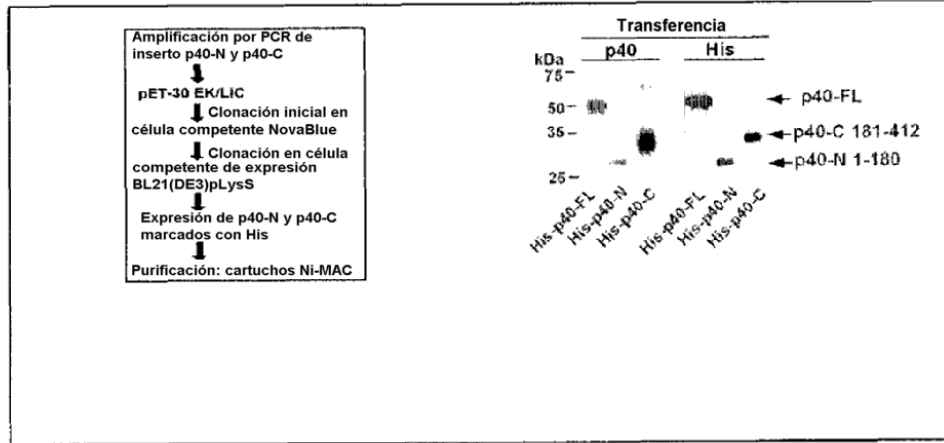


FIG. 12

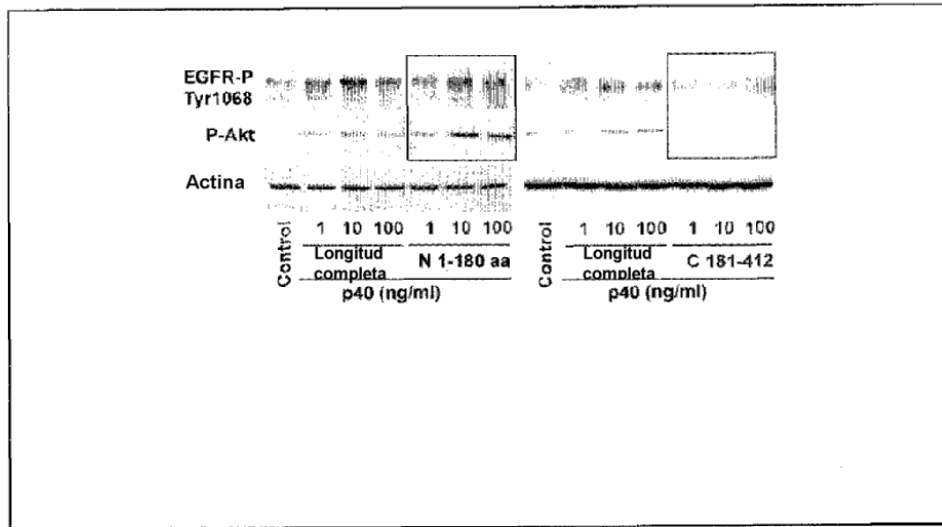


FIG. 13

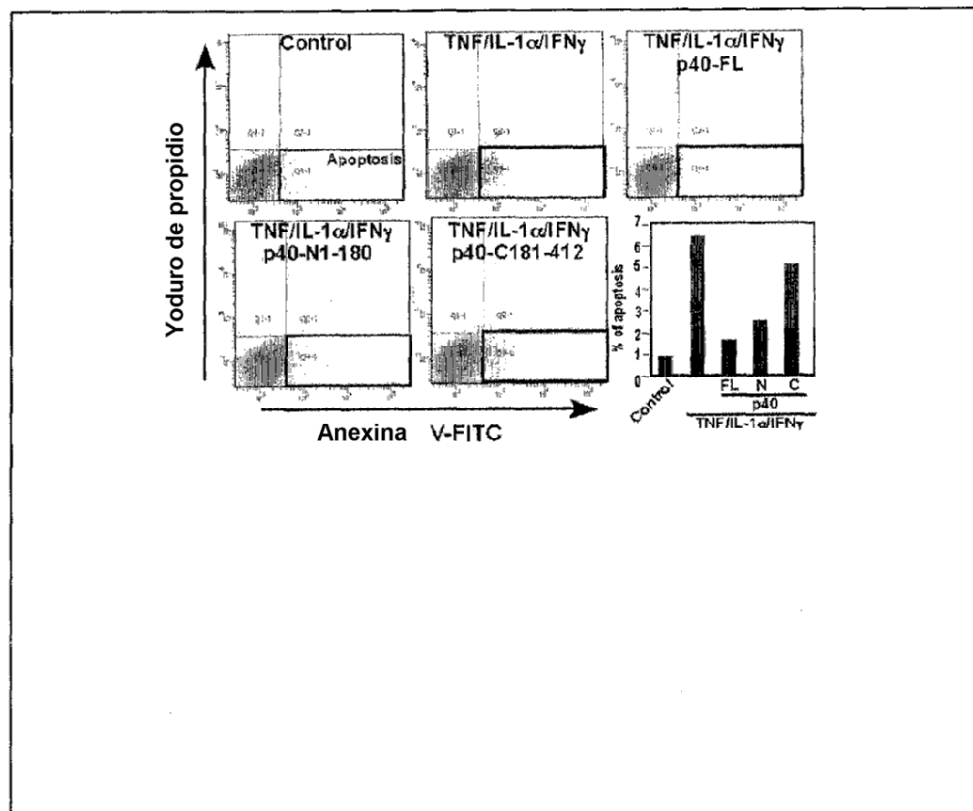


FIG. 14

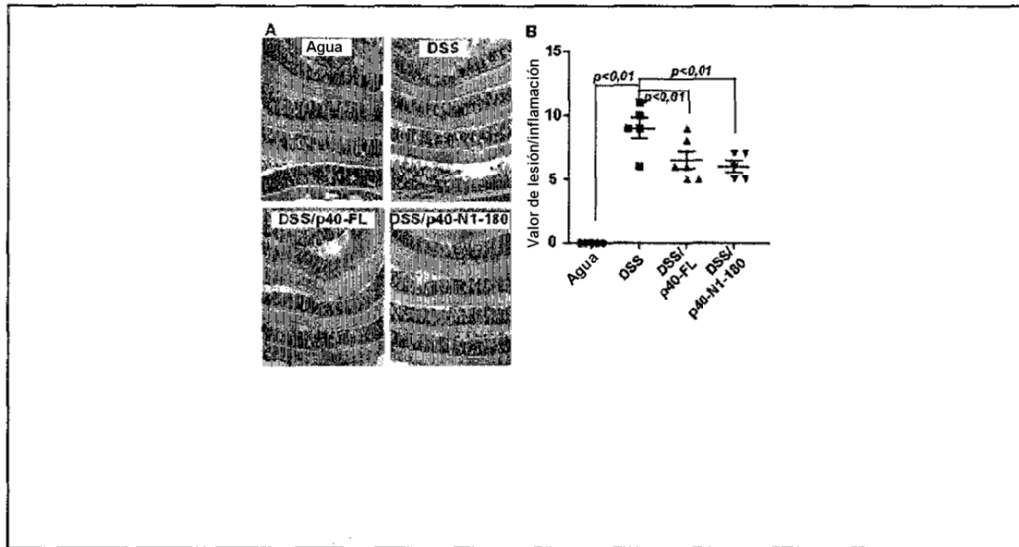


FIG. 15A-B

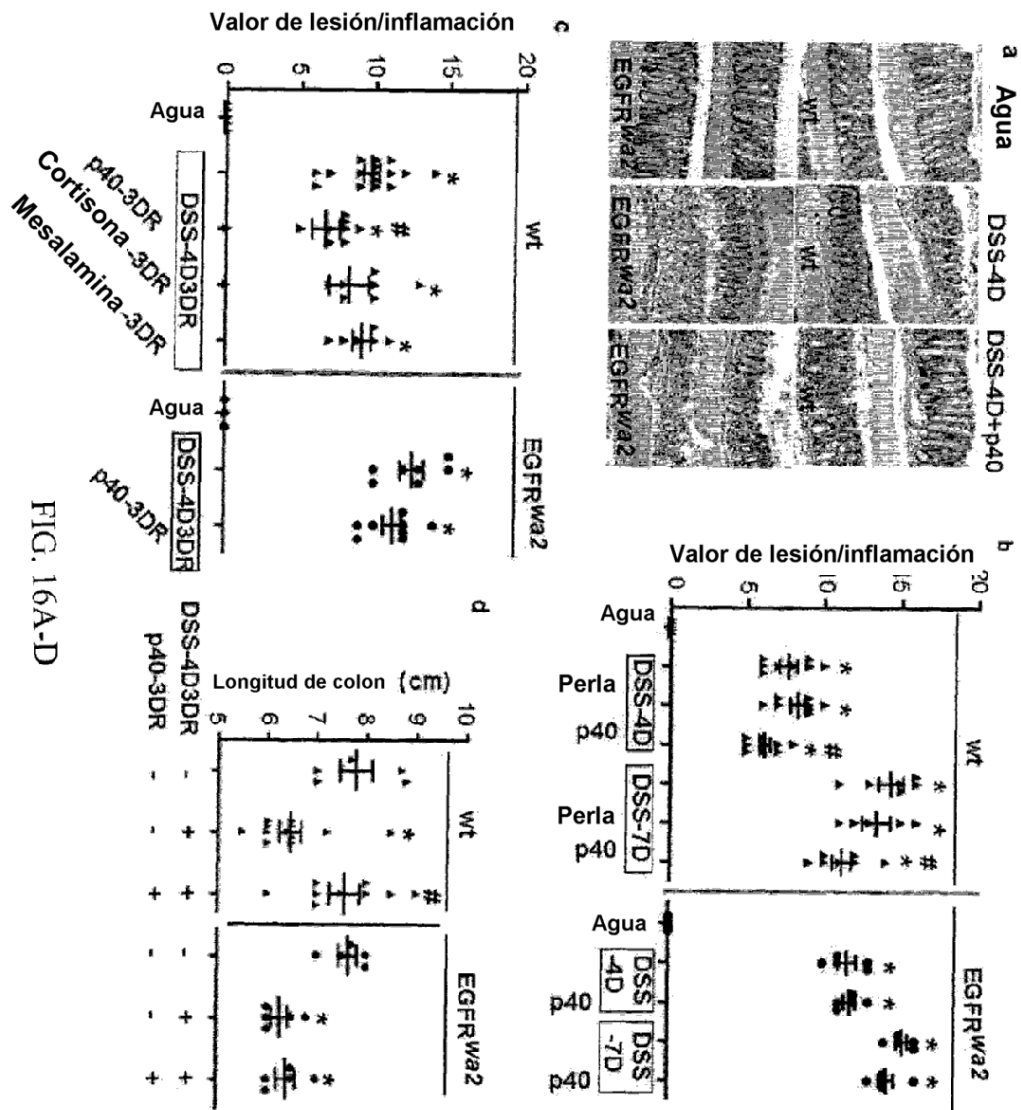


FIG. 17A-F

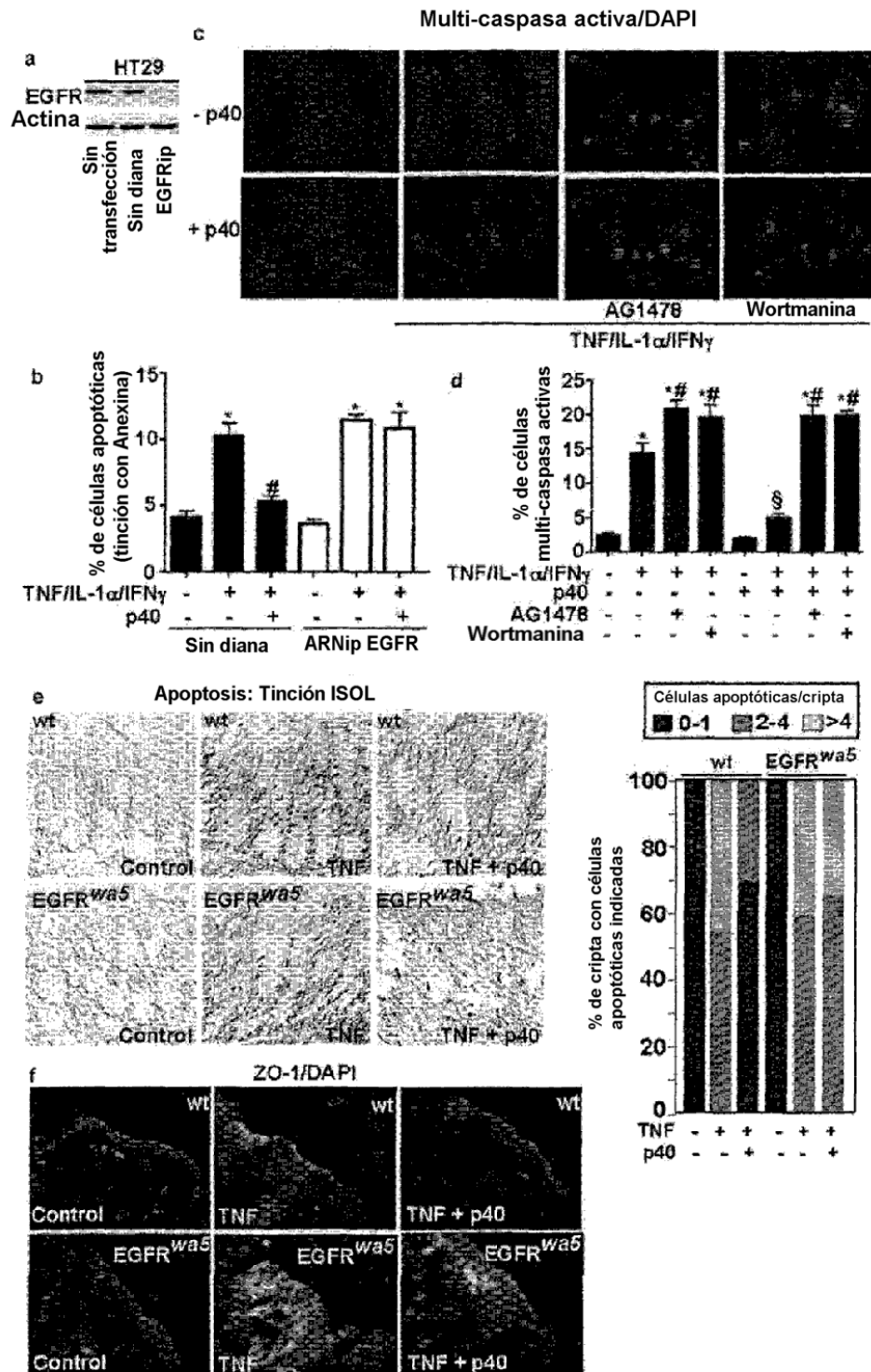


FIG. 18A-B

