

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 933**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2015 PCT/EP2015/001379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16008571**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2015 E 15736194 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3169346**

54 Título: **Propiedades antiinflamatorias de una proteína de superficie de Propionibacterium freudenreichii**

30 Prioridad:

15.07.2014 EP 14002429

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

29.10.2019

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (50.0%)**

147, rue de l'Université

75338 Paris Cedex 07, FR y

INSTITUT PASTEUR DE LILLE (IPL) (50.0%)

72 Inventor/es:

JAN, GWENAEL;

FOLIGNE, BENOIT;

FALENTIN, HÉLÈNE y

DEUTSCH, STÉPHANIE-MARIE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 728 933 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

Propiedades antiinflamatorias de una proteína de superficie de *Propionibacterium freudenreichii*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades inflamatorias basándose en el descubrimiento de una nueva proteína antiinflamatoria.

Antecedentes de la invención

10 La inflamación es un proceso biológico natural, que constituye una parte normal de la respuesta a las lesiones o infecciones. Este proceso contribuye a la protección del organismo contra agresiones internas o externas. Sin embargo, una disfunción de los mecanismos de inflamación, particularmente una inflamación persistente o demasiado abundante, puede causar importantes enfermedades dolorosas y potencialmente mortales. Tales enfermedades comprenden trastornos de la piel, trastornos intestinales, algunos trastornos neurológicos, artritis, enfermedades autoinmunes... Entre ellos, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de trastornos caracterizados por una inflamación crónica y recurrente del tracto gastrointestinal. La forma más común de este grupo es la enfermedad de Crohn. La patogenia implica una activación inadecuada y continua del sistema inmunitario de la mucosa impulsada por la presencia de la microbiota intestinal en un paciente genéticamente predispuesto.

Ahora, varias de estas enfermedades inflamatorias permanecen sin tratamiento o sin tratamiento suficiente. Por lo tanto, estudiar y encontrar nuevas estrategias de tratamiento antiinflamatorio constituye un asunto importante en medicina e investigación biomédica.

20 *Propionibacterium freudenreichii* es una bacteria beneficiosa utilizada en la industria alimentaria como productora de vitaminas, como conservante biológico, como iniciador de maduración de queso y como probiótico. Se sabe que se adhiere a las células epiteliales intestinales y al moco, y que modula funciones importantes de la mucosa intestinal, incluida la proliferación celular y la respuesta inmunitaria.

25 Del documento de patente de EE.UU. 8,241,684, se consideró que *Propionibacterium freudenreichii* produce estimuladores del crecimiento bifidogénicos (BGS, por sus siglas en inglés), entre los cuales su componente activo era ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico (DHNA, por sus siglas en inglés); se sabe que dicho DHNA tiene efectos sobre la promoción del crecimiento de las bifidobacterias y la mejora de los trastornos inflamatorios de la mucosa en las EII, así como la supresión de la infiltración de las células inmunitarias activadas.

Compendio de la invención

30 La presente invención se basa en el descubrimiento por los presentes autores de las propiedades antiinflamatorias de un componente distinto y específico de la bacteria *Propionibacterium freudenreichii*.

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.

Particularmente, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal.

35 La invención abarca además una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, un vector que comprende un ácido nucleico de la invención y una célula anfitriona que comprende una secuencia de ácido nucleico y/o un vector de la invención, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.

40 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula anfitriona de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente para el tratamiento o prevención de la enfermedad inflamatoria.

La invención también se refiere a un método para la selección de bacterias que tienen propiedades inmunomoduladoras que comprenden la etapa de:

- a) Cultivar una bacteria en un medio que comprende lactato de sodio e hidrolizado de caseína,
- b) Preparar un extracto de muestra de proteína a partir de la bacteria de la etapa a),
- 45 c) Medir el nivel de expresión del polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, un derivado conservativo o un fragmento del mismo, en el extracto de muestra de proteína preparado en la etapa b), y
- d) Seleccionar las bacterias que expresan dicho polipéptido como se define en la etapa c).

50 Finalmente, la invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria en un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, una secuencia de ácido nucleico, un vector o una célula anfitriona de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un gel de SDS PAGE de extracto de hidrocloreto de Guanidina de *P. freudenreichii*.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína slpB.

5 La Figura 3 muestra la producción de IL-6 e IL-10 de PBMC puestas en contacto con extracto de hidrocloreto de guanidina de *P. freudenreichii*.

La Figura 4 muestra la producción de IL-12, IFN- γ y TNF- α de PBMC puestas en contacto con extracto de hidrocloreto de guanidina de *P. freudenreichii*.

La Figura 5 muestra la producción de IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ y TNF- α de PBMC puestas en contacto con extracto de hidrocloreto de guanidina de *P. freudenreichii* en conjunción, o no, con *Lactococcus lactis* MG 1363.

10 La Figura 6 muestra la producción de IL-12, IL-10 y TNF- α de PBMC puestas en contacto con *P. freudenreichii* eliminada o no de la expresión del gen *slpB*.

15 La Figura 7 muestra el impacto del consumo de queso monoxénico prensado en presencia de *P. freudenreichii* sobre la gravedad de la colitis inducida por TNBS. (A) Pérdida de peso corporal (como porcentaje del peso inicial) en los grupos sanos, CTL, MTX y *Pf*. (B) Longitud del colon. (C) Puntuaciones macroscópicas de Wallace. (D) Puntuaciones histológicas de Ameho. Los datos representan la media \pm SEM de 7 a 10 ratones por grupo. * $p < 0.05$ frente al grupo CTL y # $p < 0.05$ frente al grupo MTX. (E) a (H) ilustran la estructura del colon de los ratones.

20 La Figura 8 muestra el impacto del consumo de queso monoxénico prensado en presencia de *P. freudenreichii* sobre la inflamación en la colitis inducida por TNBS. (A) Niveles séricos de IL-6 en los grupos sanos, CTL, MTX y *Pf*. (B) Niveles de amiloide A sérico (SAA, por sus siglas en inglés). (C) Actividad de mieloperoxidasa (MPO) colónica. (D) Niveles de expresión de ARNm colónico de *Il6*. (E) Nivel de expresión de ARNm colónico de *Ppar γ* . Los datos representan la media \pm SEM de 7 a 10 ratones por grupo. * $p < 0.05$ frente al grupo CTL y # $p < 0.05$ frente al grupo MTX.

25 La Figura 9 muestra el impacto del consumo de queso monoxénico prensado en presencia de *P. freudenreichii* sobre el estrés oxidativo del colon y el daño de las células epiteliales en la colitis inducida por TNBS. (A) Niveles de expresión de ARNm colónico de *Cox2* en los grupos sanos, CTL, MTX y *Pf*. (B) Niveles de expresión de ARNm colónico de *Hmox*. (C) Niveles de expresión de ARNm colónico de *Zo1*. Los datos representan la media \pm SEM de 7 a 10 ratones por grupo. * $p < 0.05$ frente al grupo CTL y # $p < 0.05$ frente al grupo MTX.

30 La Figura 10 muestra el impacto del consumo de queso monoxénico prensado en presencia de *P. freudenreichii* en la microbiota intestinal. Las heces se recolectaron después de 5 días de administración de agua fisiológica (grupo CTL), matriz láctea estéril (MTX) o queso *Pf* (*Pf*) y se realizó una pirosecuenciación 454 de la región V3-V4 del ADN ribosomal 16S. Distribución de bacterias a nivel de filotipo (A), nivel de familia (B) y nivel de género (C). Los datos representan la media de 10 ratones por grupo. * $p < 0.05$ frente al grupo CTL y # $p < 0.05$ frente al grupo MTX.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos de la invención.

35 Un primer aspecto de la invención se refiere a un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.

SEQ ID NO: 1	MSVRKSLTGMA LGLALTI TPLAGAVPASADTAPAPKDAITKAADWLVDYNTNCLGDKQT SYSCSNGLADVILALSSTGD AKYADEISTMTN LAPQVASYTKDNAGATAKIIITVIAA HQKPSAFGGNDLVGQLQALNAENPAGGGAWGPQLSMVALTRAGETVPEALIDATVDKQNS KGGFGWGGDTGDGDNTAIGMMATAAVAKGNPRAADSLAKAVAWAQDPANLTTDDTGSYWT NYSPTNTAGMMLMAIGDVNDPKIDVSKQMDFLIGRQLPSGAFSNTLKGSTNDNAMATI QAL QGLTMHGYLTA SAGQKNDP GTGGGTTDPGTGGGTGGGSTGGGSTGGGGSTGGGGSTGGGG STGGGGVVT PPVTQAFTDVAPSNMYFTEIQWAAANNVTTGWKNADGTASFRPLDTHRDA MAAFlyRLSGSPSYTAPATSPFTDVNPSNQFYKEICWLASQNIITGWPDGFSFRPLDNVNR DAMAAFLYRYSQVSGFQAPAASPFADVTPGSQFYTEM SWLSANGISTGWPDQTFRPVTP I ARDAMITFIYRMK HAS
--------------	---

40 El término "enfermedad inflamatoria" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier enfermedad y trastorno asociado con la inflamación. El término puede incluir, pero no se limita a, (1) enfermedades inflamatorias o alérgicas, tal como anafilaxia sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a medicamentos, alergias a picaduras de insectos; enfermedades inflamatorias del intestino, tal como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la reservoritis, la ileítis y la enteritis; vaginitis; psoriasis y dermatosis inflamatorias tal como dermatitis, eccema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, urticaria; vasculitis; espondiloartropatías; esclerodermia; enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares de hipersensibilidad y similares, (2) enfermedades autoinmunes, tales como artritis (reumatoide y psoriásica), osteoartritis, esclerosis

múltiple, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus, glomerulonefritis y similares, (3) rechazo del injerto (incluido el rechazo de aloinjerto y la enfermedad de injerto contra huésped), y (4) otras enfermedades en las que se deben inhibir las respuestas inflamatorias no deseadas (p. ej., aterosclerosis, miositis, trastornos inflamatorios del SNC tal como accidentes cerebrovasculares y lesiones craneales cerradas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, encefalitis, meningitis, osteoporosis, gota, hepatitis, nefritis, sepsis, sarcoidosis, conjuntivitis, otitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sinusitis y síndrome de Bechet).

En una realización particular de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino, que comprende la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la ileítis, la reservoritis y la enteritis.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento" significa revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección. El término "prevenir" o "prevención" se refiere a prevenir que la enfermedad o afección ocurra en un sujeto que aún no ha sido diagnosticado como que la tiene.

Como se utiliza en la presente memoria, el polipéptido de la invención abarca derivados o fragmentos de los mismos.

Según la invención, el término "derivado del mismo" tiene su significado general en la técnica y corresponde a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos referida o secuencia de ácido nucleico respectivamente, particularmente 95%, y preferiblemente 99%. El término "porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos" o "porcentaje de identidad entre dos secuencias nucleicas" se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias comparadas, obteniéndose dicho porcentaje con la mejor alineación de toda la secuencia. El término "mejor alineación" significa la alineación que permite obtener el porcentaje de identidad más elevado. Se puede realizar mediante el uso de varios algoritmos y métodos bien conocidos en la técnica y programas de ordenador basados en dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI EE.UU.). Preferiblemente, se utiliza el algoritmo BLAST.

Según la invención, el término "fragmento" se refiere a un polipéptido que es parte de una secuencia de aminoácidos de interés y que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, particularmente al menos 15 aminoácidos, más particularmente al menos 20 aminoácidos, preferiblemente al menos 30 aminoácidos, más preferiblemente al menos 40 aminoácidos.

Preferiblemente, dicho fragmento tiene una longitud de menos de 450 aminoácidos, particularmente menos de 400 aminoácidos, preferiblemente menos de 350 aminoácidos. El término es transponible a fragmentos de secuencias de ácido nucleico.

Como ejemplo, dicho fragmento puede corresponder al aminoácido 32 a 364 de la SEQ ID NO:1 correspondiente al extremo N-terminal de la proteína slpB madurada o a fragmentos de la misma.

Según la invención, dicho derivado y/o fragmento de un polipéptido de la invención son derivados conservativos o fragmentos conservativos de los mismos.

Por "fragmentos conservativos" y "derivados conservativos" de un polipéptido de la invención, se entiende respectivamente fragmentos y derivados que retienen la función, es decir, las propiedades antiinflamatorias, de dicho polipéptido de la invención.

Más específicamente, un fragmento o un derivado induce la secreción de IL-6 o IL-10 por PBMC. Dichos fragmentos conservativos y derivados conservativos son equivalentes funcionales de dicho polipéptido. Son "conservativos" porque retienen la función biológica del polipéptido original, más particularmente porque retienen un efecto antiinflamatorio equivalente.

En una realización preferida, se aísla un polipéptido de la invención o un derivado o un fragmento del mismo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término polipéptido abarca polipéptidos o proteínas después de modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, fosforilación u otras modificaciones de algunos restos de aminoácidos.

La presente invención se relaciona por lo tanto con un polipéptido como se describe para uso como un fármaco antiinflamatorio.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "fármaco antiinflamatorio" se refiere a un fármaco que reduce directa o indirectamente la inflamación en un tejido.

Un polipéptido de la invención se puede producir por métodos de síntesis de péptidos automatizados convencionales o por expresión recombinante. Los principios generales para diseñar y fabricar péptidos y proteínas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Un polipéptido de la invención se puede sintetizar en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Varios sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y se pueden utilizar de acuerdo con los protocolos conocidos. Un polipéptido de la invención también se puede sintetizar mediante tecnología de fase
 5 sólida empleando un sintetizador de péptidos ilustrativo tal como un MODELO 433 A de APPLIED BIOSYSTEMS INC. La pureza de cualquier proteína dada, generada a través de la síntesis de péptidos automatizada o mediante métodos recombinantes se puede determinar utilizando análisis de HPLC de fase inversa. La autenticidad química de cada péptido se puede establecer por cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica.

Como alternativa a la síntesis automatizada de péptidos, se puede emplear tecnología de ADN recombinante en donde
 10 una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de elección se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula anfitriona apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión como se describe en la presente memoria a continuación. Los métodos recombinantes son especialmente preferidos para producir polipéptidos más largos.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vector de expresión/anfitrión para contener y expresar la secuencia
 15 codificante de péptido o proteína. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos o vectores de expresión de ADN de cósmidos; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus (p. ej., virus mosaico de la coliflor, CaMV por sus siglas en inglés, virus del mosaico del tabaco, TMV por sus siglas
 20 en inglés) o transformados con vectores de expresión bacterianos (p. ej., Ti o plásmido pBR322); o sistemas de células animales, que incluyen sistemas de células de mamíferos. Los expertos en la técnica conocen varias técnicas para optimizar la expresión de proteínas en mamíferos. Las células de mamífero que son útiles en la producción de proteínas recombinantes incluyen, pero no se limitan a, células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), células COS (tales como COS-7), W138, BHK, HepG2, Caco 2, HT29,
 25 HEK, HCT 116, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC 12, K562 y células 293.

Los protocolos ilustrativos para la expresión recombinante de los sustratos peptídicos o polipéptidos de fusión en bacterias, levaduras y otros invertebrados son conocidos por los expertos en la técnica y se describen brevemente en la presente memoria a continuación.

En la producción recombinante del polipéptido de la invención, sería necesario emplear vectores que comprenden una
 30 secuencia de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido. Los métodos para preparar tales vectores, así como para producir células huésped transformadas con tales vectores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las moléculas de polinucleótidos utilizadas en tal esfuerzo se pueden unir a un vector, que generalmente incluye un marcador seleccionable y un origen de replicación, para la propagación en un huésped. Estos elementos de las construcciones de expresión son bien conocidos por los expertos en la técnica. En general, los vectores de expresión
 35 incluyen el ADN que codifica la proteína dada que está unida operativamente a secuencias reguladoras transcripcionales o de traducción adecuadas, tales como las obtenidas a partir de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, operadores o potenciadores de la transcripción, sitios de unión ribosomal del ARNm y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción.

La elección de un vector de expresión adecuado para la expresión del polipéptido de la invención dependerá, por
 40 supuesto, de la célula anfitriona específica que se va a utilizar, y está dentro de la experiencia del experto en la técnica.

La expresión requiere que se proporcionen señales apropiadas en los vectores, tales como potenciadores/promotores de fuentes tanto virales como de mamíferos que se pueden utilizar para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos de
 45 interés en las células anfitrionas. Normalmente, el ácido nucleico que se expresa está bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. Las secuencias de nucleótidos están unidas operativamente cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés (es decir, un polipéptido de la invención, un derivado o fragmento del mismo y similares). Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está unida operativamente
 50 a una secuencia de ADN dada si la secuencia de nucleótidos promotora dirige la transcripción de la secuencia.

De manera similar, la frase "bajo control transcripcional" significa que el promotor está en la ubicación y orientación
 55 correctas en relación con el ácido nucleico para controlar la iniciación de ARN polimerasa y la expresión del gen. Se puede utilizar cualquier promotor que impulse la expresión del ácido nucleico. No se cree que el promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés sea importante, siempre que sea capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula diana. Por lo tanto, cuando se dirige una célula humana, es preferible posicionar la región codificante de ácido nucleico adyacente y bajo el control de un promotor que se puede expresar en una célula humana. En términos generales, dicho promotor podría incluir un promotor humano o viral. Los promotores comunes incluyen, p. ej., el promotor genético temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, la [beta]-actina, el
 60 promotor de insulina de rata, el promotor de la fosfoglicerol quinasa y el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, los cuales son promotores bien conocidos y fácilmente disponibles para los expertos en la técnica,

5 se pueden utilizar para obtener una expresión de alto nivel de la secuencia codificante de interés. El uso de otros promotores de fagos bacterianos, celulares de mamíferos o virales que son bien conocidos en la técnica para lograr la expresión de una secuencia codificante de interés también se contempla, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para producir un rendimiento recuperable de la proteína de interés. Al emplear un promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y el patrón de expresión de la proteína de interés después de la transfección o transformación. También se pueden utilizar promotores inducibles.

10 Otro elemento regulador que se utiliza en la expresión de proteínas es un potenciador. Estos son elementos genéticos que aumentan la transcripción de un promotor ubicado en una posición distante en la misma molécula de ácido nucleico. Cuando una construcción de expresión emplea un inserto de ADNc, un experto en la técnica deseará típicamente incluir una secuencia de señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada del transcrito del gen. Cualquier secuencia de señal de poliadenilación reconocida por células de la especie animal transgénica seleccionada es adecuada para la práctica de la invención, tal como la hormona de crecimiento humana o bovina y las señales de poliadenilación de SV40.

15 Ácidos nucleicos, vectores y células anfitrionas de la invención.

Un segundo objeto de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.

En una realización particular de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino.

20 Como se utiliza en la presente memoria, dicha secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de ADN o de ARN.

En una realización preferida, dicha secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico SEC ID NO:2.

25 Como se utiliza en la presente memoria, dicha secuencia de ácido nucleico abarca derivados o fragmentos del mismo. Preferiblemente, dichos derivados o fragmentos son derivados o fragmentos conservativos.

En una realización preferida, se aísla dicha secuencia de ácido nucleico, derivados o fragmentos del mismo.

Un tercer objeto de la invención se refiere a un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.

30 En una realización particular de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino.

El término "vector" (o "vector de clonación" y "vector de expresión") significa el vehículo por el cual se puede introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula anfitriona, para transformar el huésped y promover la expresión (p. ej., transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

35 Típicamente, una secuencia de ácido nucleico de la invención se puede incluir en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

40 Tales vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para provocar o dirigir la expresión de dicho polipéptido tras la administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores utilizados en el vector de expresión para células animales son bien conocidos en la técnica e incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40, el promotor LTR y el potenciador del virus de la leucemia de ratón Moloney, el promotor y el potenciador de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

Según la invención, se puede utilizar cualquier vector de expresión para células animales, siempre que se pueda insertar y expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSGI beta d2-4 y similares.

45 Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares.

50 Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores de adenovirus, retrovirus, virus del herpes y AAV. Tales virus recombinantes se pueden producir mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células empaquetadoras o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Se pueden encontrar protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos en la replicación, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 y WO 94/19478.

Un cuarto objeto de la presente invención se refiere a una célula anfitriona que ha sido transfectada, infectada o transformada por una secuencia de ácido nucleico y/o un vector de la invención para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.

5 En una realización particular de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino.

El término "transformación" significa la introducción de una secuencia de ácido nucleico "extraño" a una célula anfitriona, de modo que la célula anfitriona expresará la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente un polipéptido codificado por la secuencia introducida. Una célula anfitriona que recibe y expresa el ADN o ARN introducido se ha "transformado".

10 Los ejemplos de células anfitrionas que se pueden utilizar para la invención son bien conocidos en la técnica, y algunos de ellos se describen anteriormente.

En una realización particular de la invención, dicha célula anfitriona puede ser un probiótico.

15 Dicho probiótico es una célula anfitriona, generalmente una célula de bacteria o levadura, que ha sido transfectada, infectada o transformada por una secuencia de ácido nucleico y/o un vector de la invención.

Los ejemplos de células huésped que se pueden utilizar incluyen, entre otros, *Bacillus coagulans*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus reuteri Protectis*, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, y *Streptococcus thermophilus*.

20 Los vectores y las células anfitrionas de la invención se adaptan a una administración en pacientes, preferiblemente seres humanos. Un experto en la técnica puede elegir fácilmente tales vectores y células huésped.

En una realización, la invención se refiere a un ácido nucleico, vector o célula anfitriona de la invención para uso como un fármaco antiinflamatorio.

25 Según la invención, la secuencia de ácido nucleico, el vector y la célula anfitriona de la invención se pueden utilizar para producir un polipéptido recombinante de la invención en un sistema de expresión adecuado.

Composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos.

Un quinto objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención, una secuencia de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula anfitriona de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En una realización, la invención se refiere a dicha composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

En una realización más particular de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino.

35 El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra inapropiada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno no sólido, semisólido o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo.

40 El polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la invención se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

45 En general, el polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la presente invención se administrarán como formulaciones farmacéuticas, que incluyen aquellas adecuadas para la administración oral (incluso bucal y sublingual), rectal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal o parenteral (que incluye intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para la administración por inhalación o insuflación. La forma preferida de administración es generalmente oral, utilizando un régimen de dosificación diaria conveniente que se puede ajustar según el grado de sufrimiento.

50 Un polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula anfitriona de la presente invención, junto con uno o más adyuvantes, vehículos o diluyentes convencionales, se pueden colocar en forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias. Las composiciones farmacéuticas y las formas farmacéuticas unitarias pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin principios o compuestos activos adicionales, y las formas farmacéuticas unitarias pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del principio activo en proporción con el intervalo de dosificación diaria deseado a emplear. Las composiciones farmacéuticas se pueden

5 emplear como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas rellenas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o líquidos tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas para uso oral; o en forma de supositorios para administración rectal o vaginal; o en forma de soluciones inyectables estériles para uso parenteral. Las formulaciones que contienen aproximadamente un (1) miligramo de principio activo o, más ampliamente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente cien (100) miligramos, por comprimido, son, por consiguiente, formas farmacéuticas unitarias representativas adecuadas.

10 El polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la presente invención se pueden formular en una amplia variedad de formas farmacéuticas de administración oral. Las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas pueden comprender un polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula anfitriona de la presente invención o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como el componente activo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes de desintegración de comprimidos, o un material de encapsulación. En los polvos, el vehículo generalmente es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En comprimidos, el componente activo generalmente se mezcla con el vehículo que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos contienen preferiblemente de aproximadamente uno (1) a aproximadamente setenta (70) por ciento del compuesto activo. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como vehículo, proporcionando una cápsula en la que el componente activo, con o sin vehículo, está rodeado por un vehículo, que está asociado con él. Del mismo modo, se incluyen sellos y pastillas. Los comprimidos, los polvos, las cápsulas, las píldoras, los sellos y las pastillas pueden ser formas sólidas adecuadas para la administración oral.

30 Otras formas adecuadas para la administración oral incluyen preparaciones en forma líquida que incluyen emulsiones, jarabes, elixires, soluciones acuosas, suspensiones acuosas o preparaciones en forma sólida que están destinadas a convertirse poco antes de su uso en preparaciones en forma líquida. Las emulsiones se pueden preparar en soluciones, por ejemplo, en soluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes, por ejemplo, tal como lecitina, monooleato de sorbitán o acacia. Las soluciones acuosas se pueden preparar disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, sabores, estabilizantes y agentes espesantes adecuados.

35 Las suspensiones acuosas se pueden preparar dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros agentes suspensores bien conocidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, y pueden contener, además del componente activo, colorantes, saborizantes, estabilizantes, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.

40 El polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la presente invención se pueden formular para administración parenteral (p. ej., mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua) y se pueden presentar en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes de dosis múltiples con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, por ejemplo, soluciones en polietilenglicol acuoso. Los ejemplos de excipientes oleosos o no acuosos, diluyentes, disolventes o vehículos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (p. ej., aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables (p. ej., oleato de etilo), y pueden contener agentes de formulación tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes o de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de la solución para la constitución antes de uso con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril sin pirógenos.

50 El polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la presente invención se puede formular para la administración tópica a la epidermis en forma de ungüentos, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Las pomadas y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones se pueden formular con una base acuosa u oleosa y en general también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden agentes activos en una base saborizada, normalmente sacarosa y acacia o goma tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

60 El polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la presente invención se pueden formular para la administración como supositorios. Primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una

mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el componente activo se dispersa de manera homogénea, por ejemplo, por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte después en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y solidificar.

5 El polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la presente invención se pueden formular para administración vaginal.

Pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen, además del principio activo, los vehículos que se conocen en la técnica como apropiados.

10 El polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la presente invención se pueden formular para administración nasal. Las soluciones o suspensiones se aplican directamente a la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo, con un gotero, pipeta o aerosol. Las formulaciones se pueden proporcionar en forma única o multidosis. En el último caso de un cuentagotas o pipeta, esto se puede lograr mediante la administración al paciente de un volumen apropiado y predeterminado de la solución o suspensión. En el caso de una pulverización, esto se puede lograr, por ejemplo, por medio de una bomba de pulverización atomizadora dosificadora.

15 El polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la presente invención se pueden formular para la administración en aerosol, particularmente para el tracto respiratorio e incluyendo la administración intranasal. El compuesto generalmente tendrá un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo, del orden de cinco (5) micrones o menos.

20 Dicho tamaño de partícula se puede obtener por medios conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante micronización. El principio activo se proporciona en un paquete presurizado con un propelente adecuado, tal como un clorofluorocarbono (CFC), por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, nitrógeno, óxido nitroso, dióxido de carbono u otro gas adecuado. El aerosol también puede contener convenientemente un tensioactivo tal como lecitina. La dosis de fármaco puede ser controlada por una válvula de dosificación. Alternativamente, los principios activos se pueden proporcionar en forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto en una base en polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidina (PVP). El vehículo en polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición de polvo se puede presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina o envases tipo blíster a partir de los cuales se puede administrar el polvo por medio de un inhalador.

30 Cuando se desee, las formulaciones se pueden preparar con recubrimientos entéricos adaptados para la administración de liberación sostenida o controlada del principio activo. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden formular en dispositivos de liberación de fármacos transdérmicos o subcutáneos. Estos sistemas de liberación son ventajosos cuando la liberación sostenida del compuesto es necesaria y cuando el cumplimiento del paciente con un régimen de tratamiento es crucial. Los compuestos en los sistemas de liberación transdérmica se unen con frecuencia a un soporte sólido adhesivo para la piel.

35 Otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma actualmente utilizada. También se pueden utilizar cápsulas no degradables o cápsulas gastrorresistentes. Tales formas farmacéuticas son bien conocidas en la técnica.

40 En ciertas realizaciones, el uso de liposomas y/o nanopartículas se contempla para la administración de polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula anfitriona de la presente invención. Los liposomas son particularmente adecuados para una administración oral de un compuesto hidrófobo. La formación y el uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos por los expertos en la técnica.

45 En la realización particular del tratamiento de una enfermedad intestinal inflamatoria, más particularmente la enfermedad de Crohn, se prefiere una administración oral o rectal. Para la administración oral, se prefieren las cápsulas gastrorresistentes, no degradables y de liberación prolongada.

En la realización particular de una composición de la invención que comprende una célula anfitriona de la invención que es un probiótico, la composición se puede utilizar por administración oral.

50 En general, el polipéptido, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la célula anfitriona de la presente invención se administrarán en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes que cumplen utilidades similares. Los intervalos de dosificación adecuados suelen ser de aproximadamente 1-500 mg al día, preferiblemente de aproximadamente 1-100 mg al día, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1-30 mg al día, dependiendo de numerosos factores, tales como la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto utilizado, la ruta y forma de administración, la indicación hacia la cual se dirige la administración y las preferencias y la experiencia del médico involucrado. Un experto en la técnica de tratar tales enfermedades podrá, sin experimentación excesiva y basándose en el conocimiento personal y la divulgación de esta descripción, determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención para una enfermedad dada.

Las preparaciones farmacéuticas están preferiblemente en formas de dosificación unitaria. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de preparación, tales como comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. Además, la forma farmacéutica unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello o pastilla, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estos en forma envasada.

Un sexto objeto de la descripción se refiere a un método para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria en un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, una secuencia de ácido nucleico y un vector o una célula anfitriona de la invención.

En una realización particular de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino.

El término "paciente" se refiere a cualquier sujeto, preferiblemente un ser humano, afectado o susceptible de estar afectado por una enfermedad inflamatoria.

Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad suficiente del agente para proporcionar el resultado biológico deseado en una relación razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico. Ese resultado puede ser la prevención, reducción y/o alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico que tiene o está en riesgo de tener tales signos, síntomas o enfermedad. Una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual se puede determinar por un experto en la técnica utilizando experimentación rutinaria.

Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y como factores bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es bien conocido por los expertos en la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos se puede variar en un amplio rango de 0,01 a 1000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosis al paciente a tratar. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Generalmente, una cantidad eficaz del fármaco se suministra a un nivel de dosis de 0.0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0.001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

Composiciones alimenticias y métodos terapéuticos.

Un séptimo objeto de la invención se refiere a una composición alimentaria que comprende un polipéptido de la invención, una secuencia de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula anfitriona de la invención y una matriz láctea.

En una realización, la invención se refiere a dicha composición alimentaria para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

En una realización más particular de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino.

El término "matriz láctea" (MXT) se refiere a cualquier producto que contiene leche, por ejemplo, nata, leche homogeneizada, suero de leche, mantequilla, yogur, queso, etc. La leche se puede obtener de ganado, búfalos, cabras, ovejas, caballos, burros, yaks, camellos o renos.

En general, las células anfitrionas de la presente invención que expresan proteína SlpB endógena o exógena en su superficie se utilizan para producir nuevos productos lácteos fermentados. Los productos lácteos fermentados preferidos son el queso. Los productos lácteos fermentados más preferidos son el queso monoxénico, es decir, las matrices de queso fermentadas por una bacteria única utilizada como única cepa iniciadora de productos lácteos.

Las composiciones alimenticias también pueden contener aditivos alimentarios, y otros ingredientes funcionalmente necesarios para el procesamiento. Según el GENERAL STANDARD FOR FOOD ADDITIVES CODEX STAN 192-1995 del Codex Alimentarius, el término "aditivos alimentarios" significa cualquier sustancia que normalmente no se consume como un alimento por sí mismo y no se utiliza normalmente como un ingrediente típico del alimento, tenga o no valor nutritivo, cuya adición intencional a los alimentos para un propósito tecnológico (incluido el organoléptico) en la fabricación, el procesamiento, la preparación, el tratamiento, el envasado, el envío, el transporte o el

almacenamiento de dichos alimentos, resulte o pueda esperarse razonablemente que resulte (directa o indirectamente), en él o en sus subproductos que se convierten en un componente de o que por otro lado afectan las características de tales alimentos. El término no incluye contaminantes o sustancias añadidas a los alimentos para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.

Las composiciones alimenticias se pueden emplear como sólidos, tales como productos de panadería, queso, leche en polvo, semisólidos tales como yogur, mantequilla, crema o líquidos tales como leche. Las formulaciones que contienen aproximadamente 10^9 UFC de células anfitrionas de la presente invención por 1000 mg de composición alimentaria, o más ampliamente, de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{10} UFC de células anfitrionas de la presente invención por 1000 mg de composición alimentaria son adecuadas para el propósito de la invención.

Las composiciones alimenticias se pueden consumir crudas o diluidas en un líquido apropiado para la alimentación intragástrica. Como líquido apropiado se destina agua o aceite extraído de vegetales o pescado.

Las composiciones alimenticias proporcionan un nuevo producto funcional fermentado para estudios preclínicos y clínicos dirigidos a la prevención o el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

15 Método para la detección de bacterias que tienen propiedades inmunomoduladoras.

Un octavo objeto de la invención se refiere a un método para la detección de bacterias que tienen propiedades inmunomoduladoras que comprende la etapa de:

- a) Cultivar una bacteria en un medio que comprende lactato de sodio e hidrolizado de caseína,
- b) Preparar un extracto de muestra de proteína a partir de la bacteria de la etapa a),
- 20 c) Medir el nivel de expresión del polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, un derivado conservativo o un fragmento del mismo, en el extracto de muestra de proteína preparada en la etapa b), y
- d) Seleccionar las bacterias que expresan dicho polipéptido como se define en la etapa c).

En el contexto de la invención, el término "propiedades inmunomoduladoras" se refiere a la capacidad de modular la acción de las células inmunitarias. Por "células inmunitarias" se entienden las células del sistema inmunitario. Dichas células comparten mecanismos específicos tales como la fagocitosis, lisis y la síntesis de citoquinas. Preferiblemente, las bacterias a las que se dirige el método de detección según la invención son aquellas capaces de interferir con uno de estos mecanismos. Más específicamente, las bacterias a las que se dirige el método de detección según la invención son aquellas capaces de interferir con la síntesis de citoquinas, y especialmente con la síntesis de interleucinas. Las interleucinas pueden tener propiedades pro o antiinflamatorias en las células involucradas en enfermedades inflamatorias. En el contexto de la presente invención, las bacterias que tienen propiedades inmunomoduladoras pueden aumentar la síntesis de interleucinas antiinflamatorias o disminuir la síntesis de interleucinas proinflamatorias.

Preferiblemente, las bacterias se cultivan en un medio que comprende nutrientes adecuados para su crecimiento. Las bacterias identificadas por el método de detección según la invención pueden utilizar diferentes fuentes de carbono y energía, es decir, carbohidratos tales como lactosa o lactato. Estas bacterias también pueden utilizar diferentes fuentes de nitrógeno, es decir, peptona, aminoácidos, nitrógeno mineral. Particularmente, dicho medio comprende L-lactato de sodio e hidrolizado de caseína. La adición de L-lactato de sodio en los medios facilita el crecimiento de bacterias. La adición de hidrolizado de caseína permite reducir el tiempo de generación. Estos compuestos cumplen con los requerimientos nutricionales de las bacterias, especialmente en relación con el nitrógeno y el carbono.

En una realización particular de la invención, las concentraciones de L-lactato de sodio y de hidrolizado de caseína en el medio utilizado para cultivar bacterias según el método para la detección de bacterias que tienen propiedades inmunomoduladoras son respectivamente 50 mM y 5 g/l.

En una realización más particular de la invención, la bacteria de la etapa a) es una propionibacteria cultivada en un medio apropiado para su crecimiento. Como ejemplo, dicho medio apropiado puede ser YEL, melazas, suero de leche o cualquier otro medio adecuado bien conocido por el experto.

Dado que el polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, un derivado conservativo o un fragmento del mismo, pertenece a la familia de proteínas de superficie asociadas no covalentemente a la pared celular, el extracto de muestra de proteína resultante de bacterias cultivadas de la etapa a) se prepara en presencia de un compuesto capaz de interrumpir la unión entre dicho polipéptido y la pared celular de la bacteria. Este tipo de compuestos son bien conocidos por el experto. Como ejemplo, dicho compuesto puede ser hidrocloreuro de guanidina. En una realización particular del método según la invención, el extracto de muestra de proteína de la etapa b) se obtiene incubando las bacterias cultivadas en la etapa a) en una solución que comprende hidrocloreuro de guanidina. Preferiblemente, la concentración del hidrocloreuro de guanidina utilizada en la solución para preparar el extracto de muestra de proteína varía entre 4 M y 8 M.

En el contexto del método de la invención, el término "medir el nivel de expresión" del polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, un derivado conservativo o un fragmento del mismo se refiere

a la capacidad para detectar su presencia dentro de la mezcla de proteínas del extracto de muestra de proteína. La detección de la presencia del polipéptido se puede realizar por varios medios, todos bien conocidos por los expertos.

5 Preferiblemente, el nivel de expresión del polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, un derivado conservativo o un fragmento del mismo, se puede detectar utilizando un anticuerpo específico.

En una realización particular de la invención, el nivel de expresión del polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, un derivado conservativo o un fragmento del mismo, se puede detectar utilizando espectroscopia de masas.

10 Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferidos para hacer y practicar la presente invención. Sin embargo, se debe entender que los ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

1) Predicción de la localización subcelular de las proteínas predichas.

15 El análisis del borrador de secuencia genómica de la cepa ITG P20 de *P. freudenreichii* reveló 2324 genes de codificación de proteínas predichos. Este número es cercano al del tipo CIRM-BIA 1^T, el primer genoma secuenciado disponible públicamente de *P. freudenreichii*, que contenía 2439 genes codificantes de proteínas.

2) Extracción y análisis de proteínas de superficie asociadas de forma no covalente a la pared celular.

20 La cepa ITG P20 de *P. freudenreichii*, también llamada CIRM-BIA 129, fue proporcionada por el Centro de Recursos Biológicos CIRM-BIA (Centre International de Ressources Microbiennes - Bactéries d'Intérêt Alimentaire, INRA, Rennes, Francia). Se cultivó a una temperatura de 30°C sin agitación en ultrafiltrado de leche de vaca enriquecido con 50 mM de L-lactato sódico (GALAFLOW SL60, ARNAUD) y 5 g/l de hidrolizado de caseína (ORGANOTECHNIE), esterilizado por filtración a 0.2 µm (NALGENE). El ultrafiltrado de leche se produjo utilizando un equipo piloto UF (T.I.A) equipado con membrana espiral orgánica con un umbral de corte de peso molecular de 5 kDa (KOCH INTERNATIONAL). El crecimiento se controló espectrofotométricamente a 650 nm (OD₆₅₀), así como contando las unidades formadoras de colonias (UFC) en medio YEL que contenía un 1.5% de agar. Se recolectaron 100 ml de cultivo de bacterias en fase estacionaria (76 horas, 10⁹ UFC/ml) por centrifugación (6000 x g, 10 min, a una temperatura de 4°C) y se lavaron en un volumen igual de PBS antes de resuspender en hidrocloreto de guanidina 5 M hasta una OD₆₅₀ final de 20. La suspensión se incubó 15 min a una temperatura de 50°C antes de la centrifugación (21000 x g, 20 min, a una temperatura de 30°C) para eliminar las células. Después, el sobrenadante se dializó exhaustivamente contra SDS al 0.1% en agua destilada durante 24 horas a una temperatura de 4°C utilizando un casete de diálisis Slide-A-Lyer® con un umbral de corte de 10000 kDa (THERMOSCIENTIFIC) antes de las investigaciones proteómicas.

Las proteínas obtenidas se analizaron en SDS PAGE en comparación con el extracto de proteína de células completas y el sobrenadante de cultivo.

35 La figura 1 muestra un extracto de proteína de células completas (línea 1), el sobrenadante del cultivo (línea 2) y un extracto de hidrocloreto de guanidina (línea 3) separados en SDS PAGE al 10%.

Este análisis electroforético reveló la presencia de cinco bandas de proteínas en el extracto de guanidina (figura 1, carril 3). El carril de gel número 3 se cortó en tiras y todas las tiras se sometieron a digestión con tripsina en gel seguida de un análisis por nano-LC-MS/MS.

40 Cinco proteínas, indicadas en las zonas de gel correspondientes en la Figura 1, se identificaron claramente por MS/MS con 3 a 34 péptidos únicos. Estos fueron internalina A (InIA), proteína de superficie grande A (IspA), proteína de superficie con dominio SLH E (slpE), proteínas de la capa de superficie slpA y slpB.

45 La proteína de la capa de superficie principal, SlpB, se caracterizó adicionalmente utilizando LC-MS para la determinación precisa de la masa molecular. Se separó mediante cromatografía de fase inversa y el pico principal (tiempo de elución 31 minutos) dio una señal clara de MS. El correspondiente espectro de MS sin procesar que muestra una envoltura de estado de carga de proteína única permitió la reconstrucción de un espectro de masas desconvolucionado. El peso molecular promedio deducido de esta proteína fue de 54147 Da, con una precisión de +/- 5 Da, considerando los treinta estados de carga más intensos de la proteína visibles en el espectro de masas. Esta masa no se correspondió con ninguna de las predichas para las 5 proteínas identificadas en este extracto. Sin embargo, se predijo un péptido señal de 29 restos utilizando la herramienta PHOBIUS (Stockholm Bioinformatics Center) en la secuencia del gen slpB de 556 restos (véase la Figura 2). La resultante proteína procesada de 527 restos tenía una masa teórica de 54145 Da, que es compatible con la masa experimental de 54147 Da, considerando la precisión de la medida espectrométrica. Esto confirma que la slpB procesada es la proteína principal en el extracto de guanidina de *P. freudenreichii* ITG P20.

55 3) Propiedades inmunomoduladoras de proteínas de superficie no covalentemente asociadas a la pared celular.

Se realizó una extracción preparativa de hidrocloreto de guanidina en *P. freudenreichii* ITG P20. Las propiedades inmunomoduladoras del extracto se evaluaron en PBMC humanas, en comparación con las propionibacterias intactas.

5 Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de la sangre de tres donantes sanos y se prepararon cepas bacterianas de referencia como se describió anteriormente (FOLIGNÉ *et al.*, *World J Gastroenterol.*, vol.13 (2), 236-243, 2007). Las propionibacterias se recolectaron a partir de ultrafiltrado de leche fermentada y se extrajeron con guanidina (como se describió anteriormente) o se dejaron sin tratar. Las propionibacterias, extraídas o no, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS que contenía 20% de glicerol a la misma densidad (turbidimetría Mc Farland unidad 3, como se describió anteriormente). Después se añadieron a PBMC a una proporción de propionibacterias a células inmunes de 5. Finalmente, se dializó ampliamente un extracto de proteína de superficie de hidrocloreto de guanidina de *P. freudenreichii* (ver más arriba) contra PBS, se cuantificaron las proteínas utilizando el ensayo de Bradford. Después se añadieron diferentes cantidades (de 0.5 a 50 µg, véase Figura 3) de proteínas de superficie extraídas a las PBMC. Después de la estimulación de 24 h, los sobrenadantes de cultivo se recogieron, se aclararon por centrifugación y se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta el análisis de citoquinas. Estos se cuantificaron mediante ELISA utilizando anticuerpos proporcionados por los sistemas de investigación y desarrollo, para IL-6 y TNF-α o por BD Pharmingen para IL-10, IL-12 e IFN-γ.

20 Las figuras 3 A y B muestran la producción de IL-10 e IL-6, respectivamente, por células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, por sus siglas en inglés) en respuesta a la estimulación con bacterias de referencia *Bifidobacterium longum* BB536 y *Lactococcus lactis* MG 1363 (barras blancas), con *Propionibacterium freudenreichii* ITG P20, ya sea sin tratar (barras negras) o tratadas con guanidina (barras rayadas), o con 0.5, 1.0, 5.0 y 50 µg de proteínas extraídas con guanidina (barras grises). Los datos se expresan en pg/ml como media ± SEM (n = 3 donantes sanos).

25 Las figuras 4 A, B y C muestran la producción de IL-12, IFN-γ y TNF-α respectivamente por células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) en respuesta a la estimulación con bacterias de referencia *Bifidobacterium longum* BB536 y *Lactococcus lactis* MG 1363 (barras blancas), con *Propionibacterium freudenreichii* ITG P20, sin tratar (barras negras) o tratadas con guanidina (barras rayadas), o con 0.5, 1.0, 5.0 y 50 µg de proteínas extraídas de guanidina (barras grises). Los datos se expresan en pg/ml como media ± SEM (n = 3 donantes sanos).

30 Los resultados establecieron que el extracto de proteína de superficie de guanidina indujo la liberación de IL-10 e IL-6, de forma dependiente de la dosis (Figura 3 A y B), con poco o ningún efecto sobre IL-12, TNF-α e IFN-γ (Figura 4 A a C), en PBMC humanas. Como comparación, las células intactas de *P. freudenreichii* ITG P20 indujeron la liberación de las 4 citocinas, IL-10, IL-6, TNF-α e IFN-γ. Sin embargo, la *P. freudenreichii* ITG P20 tratada con guanidina perdió la capacidad de inducir IL-10. Esto indica que las proteínas extraíbles de superficie desencadenan la liberación de las citoquinas inmunomoduladoras IL-10 e IL-6. Como control, se analizaron las mismas cantidades de albúmina de suero bovino y no se indujo la secreción de citoquinas en PBMC (datos no mostrados).

35 En un segundo experimento, las PBMC fueron estimuladas por el *Lactococcus lactis* MG 1363 proinflamatorio, por la guanidina del extracto de proteína de superficie de *P. freudenreichii*, o por la combinación de las mismas.

La figura 5 muestra la producción de citoquinas por PBMC humanas en respuesta a *L. lactis* MG 1363 (barras blancas), 50 µg de proteínas extraídas (barras grises), o la combinación de las mismas (barras rayadas). Los datos se expresan en pg/ml como media ± SEM (n = 3 donantes sanos).

40 Los resultados establecieron que *L. lactis* indujo la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-12, IFN-γ y TNF-α. Por el contrario, el extracto de guanidina indujo la secreción de IL-10 e IL-6. Además, este extracto, cuando se aplicó junto con la *L. lactis* proinflamatoria, redujo drásticamente la inducción de las citocinas proinflamatorias IL-12, IFN-γ y TNF-α por esta bacteria. Esto confirma el efecto inmunomodulador de las proteínas de superficie de *P. freudenreichii*, con un marcado perfil antiinflamatorio.

45 4) Enfoque sobre la accesibilidad superficial de dos proteínas clave.

Utilizamos los péptidos detectados mediante el afeitado (es decir, liberados a partir de células bacterianas mediante la digestión con tripsina de células vivas de *P. freudenreichii*) para especificar la topología superficial de sIpB e identificar los dominios expuestos, con mayor probabilidad de interactuar con la anfitriona.

50 Las proteínas de la capa S están involucradas en la adhesión e inmunomodulación en otras bacterias. Se anclan a la pared celular a través de interacciones electrostáticas que involucran dominios SLH y polímeros de pared celular piruvilados.

55 La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de sIpB y la accesibilidad de la superficie. La secuencia señal está destacada. Los potentes sitios de escisión de tripsina están indicados por triángulos oscuros que siguen a los restos de lisina (K) y arginina (R). Los péptidos detectados en el afeitado de la fracción extracelular están destacados, evidenciando los sitios de escisión accesibles desde la superficie. Se indican los 3 dominios SLH detectados en sIpB.

Como se muestra en la Figura 2, los péptidos liberados extracelulares cubrieron el 49% de la proteína sIpB de *P. freudenreichii*, mostrando una gran accesibilidad a la superficie de la parte N-terminal, excepto por la secuencia señal

escindible. Por el contrario, la región C-terminal, que contiene 3 dominios SLH predichos, estaba pobremente representada. Esto confirma la hipótesis de que los dominios SLH están embebidos en la capa gruesa de peptidoglicano, por lo que no son accesibles para la enzima.

5) Implicación de las proteínas SlpB en las propiedades inmunomoduladoras.

Los datos adquiridos utilizando la cepa ITG P20 / CIRM BIA 129 de *P. freudenreichii* y el extracto de guanidina dializado sugirieron fuertemente la participación de SlpB en las propiedades inmunomoduladoras de la cepa.

Para confirmar esta hipótesis, el gen de slpB correspondiente se ha mutado mediante inactivación por inserción como se describió anteriormente (DEUTSCH *et al*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.76 (9), 2740-2746, 2010). Brevemente, se construyó un vector suicida insertando un gen de resistencia al cloranfenicol en un plásmido pUC18. En el plásmido resultante, se clonó un fragmento interno de 574 pb del marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) de slpB (SEQ ID NO:3) de la cepa CIRM-BIA129, que dio como resultado el vector pUC:slpB:CmR.

Las cepas de *P. freudenreichii* que se sometieron a ensayo se transformaron con este vector y los transformantes que albergan en pUC:slpB:CmR se seleccionaron en medio de agar YEL con cloranfenicol. La estabilidad de la inserción se verifica en YEL sin cloranfenicol. La inactivación por inserción del gen slpB se verificó por amplificación de PCR del locus correspondiente.

La Figura 6 muestra la producción de citoquinas por células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) en respuesta a bacterias, de tipo salvaje o mutadas. Las citoquinas se evaluaron mediante ELISA en los sobrenadantes recogidos de cultivos de 24 h de PBMC humanas. Como comparación, también se sometió a ensayo una cepa mutada en una proteína de función desconocida, Pouf 4640.

El mutante resultante se comparó con la cepa de tipo salvaje con respecto a la inducción de citoquinas en PBMC humanas. Como se muestra en la Figura 6, la inactivación del gen slpB (slpB^{-/-}) condujo a una reducción drástica de los niveles de citoquinas inducidas. Por el contrario, la inactivación del gen Pouf 4640 (4640^{-/-}) tuvo poco o ningún efecto sobre las propiedades inmunomoduladoras de *P. freudenreichii*.

En conclusión, hemos demostrado que slpB es un factor clave de la inmunomodulación de *P. freudenreichii*.

6) Estudio preclínico del efecto antiinflamatorio de la proteína SlpB *in vivo*.

6.1 - Crecimiento bacteriano y producción de iniciadores.

La cepa ITG P20 de *P. freudenreichii*, también llamada CIRM-BIA 129, fue proporcionada por el Centro de Recursos Biológicos CIRM-BIA (Centre International de Ressources Microbiennes - Bactéries d'Intérêt Alimentaire, INRA, Rennes, Francia) y se cultiva habitualmente en medio YEL. Para la producción de iniciadores, se cultivó en un medio de calidad alimentaria que consiste en ultrafiltrado de leche enriquecido con 50 mM de L-lactato sódico (galaflo SL60, Société Arnaud, París, Francia) y 5 g/l de hidrolizado de caseína (Organotechnie, La Coumeuve, Francia), esterilizados por filtración de 0.2 µm (Nalgene, Roskilde, Dinamarca) como se describió anteriormente (COUSIN *et al.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7917-7927, 2012).

6.2 - Elaboración de queso monoxénico.

Los cultivos iniciadores descritos anteriormente se utilizaron para inocular (población inicial 10⁶ UFC/ml) leche de vaca cruda descremada microfiltrada enriquecida con 100 g/l de leche en polvo (Promilk®852B, Ingredia, Francia), 5 g/l de peptona de caseína más (Organotechnie, La Coumeuve, Francia) y 150 g/l de nata. Esta leche enriquecida que contenía, por litro, 105 g de proteínas, 110 g de lípidos y 40 g de lactosa, se esterilizó en autoclave antes de la inoculación. Después de 72 horas a una temperatura de 30°C, la población final de propionibacterias fue de 2.50 (±0.82) 10⁹ UFC/ml con un pH de 5.5. El queso fue fabricado en condiciones estériles bajo flujo laminar: adición de coagulante (chy-max®Extra, Chr. Hansen), coagulación a una temperatura de 32°C, corte de la cuajada, calentamiento a una temperatura de 40°C durante 10 min, moldeo y prensado. El queso monoxénico prensado se secó después bajo flujo laminar durante 1 hora, se envolvió al vacío en bolsas de maduración estériles y se almacenó a una temperatura de 4°C. La población de propionibacterias, determinada en agar de litio-glicerol como se describe anteriormente (FALENTIN *et al.*, *Food Microbiology*, vol.29, 132-140, 2012), fue de 9.69 (±4.70) 10⁹ UFC/g. Los contaminantes, verificados en placa de agar agar, estaban por debajo de 100 UFC/g. Como control, se preparó una matriz láctea estéril utilizando la acidificación con gluconodelta lactona de la leche enriquecida estéril mediante coagulación, corte, moldeo y prensado como se describe anteriormente.

6.3 - Colitis experimental.

6.3.1 - Cuidado de los animales y aspectos éticos.

Se obtuvieron ratones BALB/c hembra (6 semanas de edad a la llegada) de Charles River Laboratories (Saint-Germain sur l'Arbresle, Francia). Los animales se dividieron aleatoriamente en temperatura controlada (con una temperatura de 22°C, a un ciclo de luz/oscuridad de 12h/12h y acceso a la comida y agua ad libitum). Todos los experimentos con animales se realizaron según las guías del comité de cuidado y uso de animales del *Institut Pasteur de Lille* y de

conformidad con el protocolo de Ámsterdam sobre protección y bienestar de los animales y la directiva 86/609/CEE sobre la protección de los animales utilizados para experimentos y otros fines científicos (actualizado en el Apéndice A del Consejo de Europa). El trabajo con animales también cumplía con la legislación francesa (la Ley Francesa 87-848, de 19-10-1987) y la enmienda de las comunidades europeas de la ley de crueldad contra los animales de 1976). Los objetivos y procedimientos del estudio fueron aprobados por el comité de ética y bienestar de la región Nord-Pas-de-Calais para experimentos con animales (Lille, Francia, número de aprobación: 19/2009R).

6.3.2 - Procedimiento de alimentación.

Tanto el queso monoxénico como la matriz láctea estéril correspondiente se homogeneizaron en agua fisiológica justo antes de la alimentación. A los grupos de 10 ratones se les administró agua fisiológica ("ratones control", CTL etiquetados), 100 mg de la matriz láctea (MTX) o 100 mg de queso *Pf* que contenía 10^9 UFC de *P. freudenreichii*, a través de la vía intragástrica. Los tratamientos se administraron diariamente durante cinco días consecutivos.

6.3.3 - Colitis inducida por TNBS y puntuación de inflamación.

La colitis aguda se desencadenó el día 5 por administración intra-rectal de 50 μ l de TNBS para alcanzar 100 mg/kg de peso corporal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en NaCl al 0.9%/etanol (50/50 v/v) (DROUVAULT-HOLOWACZ *et al.*, *Clin.Nutr.*, Vol. 25, 994-1003, 2006). Los animales se monitorizaron diariamente para la pérdida de peso corporal. Tres días después de la inducción de colitis, los ratones se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre inmediatamente. El suero se separó y se congeló (-20°C) hasta que se realizaron los ensayos de proteínas. Después de la disección y la medición de la longitud del colon, dos observadores independientes puntuaron ciegamente la inflamación macroscópica del colon en la Escala de Wallace (WALLACE *et al.*, *Gastroenterology*, vol.96, 29-36, 1989). Las muestras para el análisis histológico se fijaron en formaldehído al 4%, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μ m se tiñeron con reactivos de May-Grünwald-Giemsa. Tras un examen bajo un microscopio, las lesiones tisulares se puntuaron según los criterios de Ameho (AMEHO *et al.*, *Gut*, vol.41, 487-493 1997). Por último, los segmentos de colon también se retiraron y almacenaron a una temperatura de -20°C para realizar más ensayos de actividad de mieloperoxidasa (MPO).

6.3.4 - Análisis de biomarcadores.

Los niveles de IL-6 y SAA murinos se midieron mediante ELISA utilizando anticuerpos comerciales de BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ) y Tridelta Development Ltd. (Maynooth, Irlanda), respectivamente, con un límite inferior de detección de 126 pg/ml y 31 μ g/ml. Por último, el grado de infiltración de los neutrófilos polimorfonucleares en el colon distal se evaluó mediante la actividad de la MPO, como se describió anteriormente (BRADLEY *et al.*, *J.Invest Dermatol.*, Vol.78, 206-209, 1982). Para el análisis de la expresión génica, las muestras del colon distal (0.5 cm del área inflamada) se procesaron en una solución de estabilización de ARN (ARN-later, Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se almacenaron a una temperatura de -80°C para un análisis posterior de la expresión génica. Después de la homogeneización de muestras utilizando el instrumento FastPrep (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE.UU.), se aisló el ARN total utilizando columnas de espín de ARN (Macherey-Nagel, Hoerd, Francia). La transcripción inversa y la PCR en tiempo real se han realizado con el kit de reacción (High capacity cDNA RT kit) y reactivos (Universal PCR Master Mix) de Applied Biosystems (Life Technologies), según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron con la máquina MX3005P Stratagene (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Para los genes *diana Il6*, *Ppary Cox2*, *Hmox* y *Zo1*, se ha utilizado un ensayo de expresión génica personalizado (Taqman, Applied Biosystems) con cebadores diseñados y validados comercialmente. El gen de mantenimiento β -actina se ejecutó como gen de referencia. Los datos registrados se analizaron utilizando el método calculado de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se expresaron como un aumento de veces sobre los valores del grupo control.

6.3.5 - Análisis de la microbiota intestinal.

El enfoque utilizado se basa en un método estandarizado y optimizado por Genoscreen dirigiendo las regiones hipervariables V3 y V4 del ADNr 16S (Metabio® Solutions, Lille, Francia). Brevemente, el ADN se extrajo de las heces utilizando el kit QIAmp Fast DNA Stool (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) modificado por Genoscreen y se cuantificó por fluorescencia. Las bibliotecas de amplicones se realizaron a partir de 5 ng de ADN extraído para amplificar las regiones V3 y V4 del ADNr 16S y añadir identificadores de muestras múltiples (SIMS®) y los adaptadores GS FLX. Después de la purificación, cada amplicón se cuantificó por fluorescencia antes de agruparse de forma equimolar para obtener la biblioteca final. La PCR en emulsión se realizó según lo recomendado por los proveedores con pequeñas modificaciones y la pirosecuenciación se llevó a cabo en un instrumento Genome Sequencer FLX de 454 Life Science (Roche, Basel, Suiza). Después se procesaron los datos de secuenciación con la tubería bioinformática online MetaBiote® (GenoScreen, Lille, Francia) comenzando con un procesamiento previo de las lecturas con los siguientes parámetros: (i) el tamaño no alcanza 200 bases y el tamaño superior a 600 bases; (ii) presencia de bases ambiguas; (iii) puntuación promedia de calidad de la base por debajo de 25; (iv) homopolímero superior a 6 bases; (v) error en la secuencia del cebador directo; (vi) error en secuencia de cebador inverso. Después utilizamos la tubería QIIME 1.8.0 (CAPORASO *et al.*, *Nat.Methods*, vol.7, 335-336, 2010) para realizar el análisis de BLAST contra la base de datos de referencia Greengenes (DESANTIS *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, 5069-5072, 2006) para la asignación de rango taxonómico.

6.4 - Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Se han utilizado ensayos no paramétricos de Mann-Whitney para calcular los niveles de significación para las mediciones. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6.5 – Resultados

6.5.1 - Las proteínas antiinflamatorias clave de *P. freudenreichii* se expresan en el queso.

La cepa CIRM BLA 129 de *P. freudenreichii* creció bien en la leche enriquecida y alcanzó poblaciones por encima de 10^9 UFC/ml en 72 horas. Se alcanzaron poblaciones cercanas a 10^{10} UFC/g en el queso monoxénico final, como resultado de la concentración al prensar y drenar la cuajada. El queso obtenido mostró las siguientes características: materia seca 43 (± 1.8) %, contenido de grasa 18.4 (± 0.8) %, grasa en materia seca 42.6 (± 0.85) %, con una población de *P. freudenreichii* de 9.69 (± 4.70) 10^9 UFC/g. Esta composición es cercana a la de los quesos tradicionales prensados.

Las bacterias se aislaron con éxito de la cuajada de queso sin lisis masiva, ni la presencia excesiva de micelas de caseína. El análisis de SDS PAGE confirmó además la presencia de un proteoma complejo celular en el sedimento bacteriano sin la presencia masiva de proteínas de la leche. Se realizó el afeitado enzimático, sin pérdida de viabilidad detectable, como recientemente se adaptó para propionibacterias (MARECHAL *et al.*, *J. Proteomics.*, Vol.113C, 447-461, 2015). Las proteínas extraíbles de guanidina, que incluyen InIA, slpA, slpB y slpE, previamente mostradas como implicadas en la inmunomodulación producida por *P. freudenreichii* en cultivos líquidos, se detectaron en particular y, por tanto, se expresaron en el queso fabricado con la cepa *P. freudenreichii* ITG P20.

6.5.2 - El queso monoxénico elaborado con *P. freudenreichii*, pero no el queso estéril, alivia la colitis inducida por TNBS en ratones.

La colitis inducida por TNBS condujo a la mortalidad en los grupos CTL y MTX. En contraste, el consumo de queso fermentado por *P. freudenreichii* CIRM BIA 129 (*Pf*) protegió a los ratones contra la mortalidad (datos no mostrados). La ingesta de queso *Pf* también restringió la pérdida de peso corporal (Figura 7A) y mejoró significativamente las puntuaciones de Wallace (Figura 7C) y Ameho (Figura 7D) en comparación con la ingesta de agua fisiológica (CTL) o de matriz láctea estéril (MTX). En la histología, la característica epitelial típica que contiene criptas se puede mostrar en la Figura 7E (color negro). La colitis inducida por TNBS conduce a ruptura y necrosis del epitelio y a infiltración de granulocitos de neutrófilos importante (Figura 7F). La matriz láctea estéril (MTX) no pudo revertir los efectos de TNBS (Figura 7G). En contraste, el consumo de queso fermentado por *P. freudenreichii* CIRM BIA 129 (*Pf*) protegió a los ratones contra la necrosis (Figura 7H).

En conjunto, estos resultados mostraron que la ingesta de queso *Pf* disminuyó la severidad de la colitis inducida por TNBS.

6.5.3 – El queso monoxénico elaborado con *P. freudenreichii*, pero no el queso estéril, modula marcadores inflamatorios locales y sistémicos.

Como se muestra en la Figura 8, evaluamos el grado de inflamación en la sangre y el colon. En sangre, la ingesta de queso *Pf* condujo a una disminución significativa de los niveles de IL-6 y SAA, en comparación con la ingesta de agua fisiológica o MTX (Fig. 8A y 8B). Además, en el colon, la actividad MPO se redujo significativamente por la ingesta de queso *Pf*, en comparación con la ingesta de agua fisiológica (CTL) o de matriz láctea estéril (MTX) (Fig. 8C). Además de la actividad MPO, los niveles de expresión de ARNm de *Il6* disminuyeron significativamente en el grupo de queso *Pf* en comparación con los grupos CTL y MTX (Fig. 8D). Finalmente, esta disminución del nivel de marcador de inflamación en el colon se asoció con un aumento del nivel de expresión de ARNm de *Ppar γ* en el grupo de queso *Pf* comparado con los grupos CTL y MTX (Fig. 8E). En conjunto, la ingesta de queso *Pf* protegió a los ratones contra la inflamación inducida por TNBS.

6.5.4 - El queso monoxénico elaborado con *P. freudenreichii*, pero no el queso estéril, modula el estrés oxidativo colónico y los marcadores epiteliales.

Como se muestra en la Figura 9, la colitis inducida por TNBS condujo a un estrés oxidativo colónico como se observa por el incremento de los niveles de *Cox2* y *Hmox* en los grupos CTL y MTX. La ingesta de queso *Pf* se asocia con un decrecimiento de los niveles de expresión de ARNm de estos marcadores del estrés oxidativo. Para el nivel de expresión de ARNm de *Cox2*, no hubo diferencias significativas entre los grupos CTL y MTX. Por el contrario, la expresión disminuyó significativamente entre los grupos MTX y *Pf* ($p = 0.0608$) (Fig. 9A). Para el nivel de expresión de ARNm de *Hmox*, la ingesta de queso *Pf* condujo a una disminución significativa de este marcador en comparación con los grupos CTL y MTX (Fig. 9B). Finalmente, la ingesta de queso *Pf* restableció la integridad de la barrera intestinal. De hecho, el nivel de expresión del ARNm de *Zo1* fue bastante similar entre ratones sanos y ratones *Pf* (Fig. 9C). En conjunto, la ingesta de queso *Pf* protege a los ratones contra el estrés oxidativo colónico y los daños en las células epiteliales.

6.5.5 - Un impacto limitado en la microbiota intestinal.

Finalmente, para evaluar el impacto del producto lácteo monoxénico en la microbiota intestinal, analizamos la microbiota fecal después de 5 días de ingesta de productos lácteos. Este análisis se llevó a cabo mediante 454 pirosecuenciaciones de la región V3-V4 del ADN ribosomal 16S. La metagenómica se basa en 10 muestras individuales para cada grupo experimental. La ingesta de queso *Pf* no se asoció con cambios importantes en la composición de la microbiota fecal en ambos niveles de filo, familia y género en comparación con los grupos CTL y MTX. No se observaron evidencias de cambios importantes en la proporción de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Fig. 10A) mientras que la ingesta durante 5 días de queso *Pf* aumentó moderadamente la *Proteobacteria* a nivel de filo. Este aumento está asociado con una ligera disminución en las proporciones de *Alcaligenaceae* a nivel familiar y de *Sutterella* a nivel de género (Fig. 10A-C). Sin embargo, no parece que tales cambios menores puedan explicar los efectos biológicos adicionales que observamos después del inicio de la colitis.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> INRA Institut Pasteur de Lille JAN, Gwenael FOLIGNE, Benoît FALENTIN, Helene DEUTSCH, Stéphanie-Marie
 <120> Propiedades antiinflamatorias de una proteína de superficie de *Propionibacterium freudenreichii*
- 10 <130> INR-B-0020-PCT1
 <150> EP 14002429
 <151> 15-07-2014
- 15 <160> 3
 <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> *Propionibacterium freudenreichii*
- <400> 1
 Met Ser Val Arg Lys Ser Leu Thr Gly Met Ala Leu Gly Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Thr Ile Thr Pro Leu Ala Gly Ala Val Pro Ala Ser Ala Asp Thr Ala
 20 25 30
 Pro Ala Pro Lys Asp Ala Ile Thr Lys Ala Ala Asp Trp Leu Val Asn
 35 40 45
 Asp Tyr Asn Thr Asn Cys Leu Gly Asp Lys Gln Thr Ser Tyr Ser Cys
 50 55 60
 Ser Asn Gly Gly Leu Ala Asp Val Ile Leu Ala Leu Ser Ser Thr Gly
 65 70 75 80
 Asp Ala Lys Tyr Ala Asp Glu Ile Ser Thr Met Met Thr Asn Leu Ala
 85 90 95
 Pro Gln Val Ala Ser Tyr Thr Lys Asp Asn Ala Gly Ala Thr Ala Lys
 100 105 110
 Ile Ile Ile Thr Val Ile Ala Ala His Gln Lys Pro Ser Ala Phe Gly
 115 120 125
 Gly Asn Asp Leu Val Gly Gln Leu Gln Ala Leu Asn Ala Glu Asn Pro
 130 135 140
 Ala Gly Gly Gly Ala Trp Gly Pro Gln Leu Ser Met Val Ala Leu Thr
 145 150 155 160

ES 2 728 933 T3

Arg Ala Gly Glu Thr Val Pro Glu Ala Leu Ile Asp Ala Thr Val Asp
 165 170 175

Lys Gln Asn Ser Lys Gly Gly Phe Gly Trp Gly Gly Asp Thr Gly Asp
 180 185 190

Gly Asp Asn Thr Ala Ile Gly Met Met Ala Thr Ala Ala Val Ala Lys
 195 200 205

Gly Asn Pro Arg Ala Ala Asp Ser Leu Ala Lys Ala Val Ala Trp Ala
 210 215 220

Gln Asp Pro Ala Asn Leu Thr Thr Asp Asp Thr Gly Ser Tyr Trp Thr
 225 230 235 240

Asn Tyr Ser Pro Thr Asn Thr Ala Gly Met Met Leu Met Ala Ile Gly
 245 250 255

Asp Val Asn Asp Pro Lys Ile Asp Val Ser Lys Gln Met Asp Phe Leu
 260 265 270

Ile Gly Arg Gln Leu Pro Ser Gly Ala Phe Ser Asn Thr Leu Lys Gly
 275 280 285

Thr Asn Asp Asn Ala Met Ala Thr Ile Gln Ala Leu Gln Gly Leu Thr
 290 295 300

Met His Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ala Gly Gln Lys Asn Asp Pro Gly
 305 310 315 320

Thr Gly Gly Gly Thr Thr Asp Pro Gly Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly
 325 330 335

Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly
 340 345 350

Gly Gly Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Gly Gly Val Val
 355 360 365

Thr Pro Pro Val Thr Gln Ala Phe Thr Asp Val Ala Pro Ser Asn Met
 370 375 380

Tyr Phe Thr Glu Ile Gln Trp Ala Ala Ala Asn Asn Val Thr Thr Gly
 385 390 395 400

Trp Lys Asn Ala Asp Gly Thr Ala Ser Phe Arg Pro Leu Asp Thr Thr
 405 410 415

His Arg Asp Ala Met Ala Ala Phe Leu Tyr Arg Leu Ser Gly Ser Pro
 420 425 430

ES 2 728 933 T3

Ser Tyr Thr Ala Pro Ala Thr Ser Pro Phe Thr Asp Val Asn Pro Ser
 435 440 445
 Asn Gln Phe Tyr Lys Glu Ile Cys Trp Leu Ala Ser Gln Asn Ile Thr
 450 455 460
 Thr Gly Trp Pro Asp Gly Ser Phe Arg Pro Leu Asp Asn Val Asn Arg
 465 470 475 480
 Asp Ala Met Ala Ala Phe Leu Tyr Arg Tyr Ser Gln Val Ser Gly Phe
 485 490 495
 Gln Ala Pro Ala Ala Ser Pro Phe Ala Asp Val Thr Pro Gly Ser Gln
 500 505 510
 Phe Tyr Thr Glu Met Ser Trp Leu Ser Ala Asn Gly Ile Ser Thr Gly
 515 520 525
 Trp Pro Asp Gln Thr Phe Arg Pro Val Thr Pro Ile Ala Arg Asp Ala
 530 535 540
 Met Ile Thr Phe Ile Tyr Arg Met Lys His Ala Ser
 545 550 555

- <210> 2
- <211> 1671
- <212> ADN
- <213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 2
 atgtccgtca ggaagagcct gaccgggatg gcgctggggc ttgccctcac catcaccgg 60
 ctgcccggcg cggttccggc gtcagccgac accgcaccgg cccccaagga tgccatcacc 120
 aaggcagccg attggctggt gaatgattac aacaccaatt gtcttggcga caagcagaca 180
 agttatagct gctcgaacgg cggcctggcc gatgtcatcc tggcctgtc atccaccggt 240
 gacgcgaaat atgccgacga gatctccacc atgatgacga atttggcacc gcaggtggcc 300
 agctacacga aggacaatgc gggcgctacc gccaagatca tcatcactgt cattgccgcc 360
 catcagaaac cgagtgcctt tggggggaat gacctggtgg gccagttgca ggcactgaac 420
 gcggagaacc ccgccggtgg cggggcatgg ggaccgcagt tgtcgatggt ggctctcacc 480
 cgcgccgggg agaccgtgcc cgaggcactg atcgatgcca cagtggacaa gcaaaacagc 540
 aaggcgggct tcggtgggg cggcgacacg ggcgatggcg acaacaccgc gatcggcatg 600
 atggccaccg cggccgtcgc caagggcaac cccagggcag ccgactcgct cgccaaggcg 660
 gtcgcctggg cccaggaccg ggccaacctc accaccgatg acaccggaag ctactggacc 720
 aactactcgc ccaccaacac tgcgggcatg atgctcatgg ccatcggcga cgtgaacgac 780
 cccaagatcg acgtcagcaa gcagatggac ttcctgatcg gtcgccagct gccagtgggc 840
 gccttctcga acacactcaa gggcaccaac gacaatgcga tggccacat ccaggccctc 900

ES 2 728 933 T3

cagggcctca cgatgcacgg ctacctgacc gcttcggccg gccagaagaa tgacccgggc 960
 accggcggtg gcacgacgga tccgggcacc ggcgggcgga cgggtggcgg atcgaccggc 1020
 ggcggtcaa ctggcggtgg cggtagcacc ggcgggcgag gatcgaccgg cgggtggcgg 1080
 agcaccggtg gcggcggcgt tgtcacgccc ccggtcacc aggccttcac cgatggtgcc 1140
 ccgagcaaca tgtacttcac cgagatccag tggcgggccg ccaacaatgt gaccaccggc 1200
 tgaagaacg ccgatggcac ggcgtcgttc cgtccgctcg acaccacgca ccgacgacga 1260
 atggcgcggt tcctctaccg cctgagtgga tcgcccagct acaccgcccc ggccacctcg 1320
 ccgttcaccg acgtcaaccc gtcgaaccag ttctacaagg agatctgctg gctcgcctcg 1380
 cagaacatca ccaccggctg gcccgcggc agcttcggc cactggacaa tgtgaaccgc 1440
 gacgcgatgg cggccttctt gtaccgctac tcgcaggtct cgggcttcca ggccccggct 1500
 gcttcgccgt tcgctgacgt gacgcccggc agccagttct acaccgagat gtcgtggctg 1560
 tcagccaacg gcatctccac cggttggccc gaccagacgt tccgtccggt gacgccgatc 1620
 gcccgcgacg cgatgatcac cttcatctat cgcataaagc acgccagctg a 1671

5 <210> 3
 <211> 574
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> secuencia interna de slpB

<400> 3
 agcttaacta ctcgcccacc aacctgacgg gcatgatgct catggccatc ggcgacgtga 60
 acgaccccaa gatcgacgtc agcaagcaga tggacttctt gatcggctcg cagctgcca 120
 gtggcgcctt ctcgaacaca ctcaagggca ccaacgacaa tgcgatggcc accatccagg 180
 ccctccaggg cctcacgatg cacggctacc tgaccgctt ggccggccag aagaatgacc 240
 cgggcaccgg cgggtggcac acggatccgg gcaccggcgg cggcacgggt ggcggatcga 300
 ccggcggcgg ctcaactggc ggtggcggta gcaccggcgg cggaggatcg accggcgggt 360
 gcggtagcac cgggtggcggc ggcgttgtca cggccccggc caccagggc ttcaccgatg 420
 ttgccccgag caacatgtac ttcaccgaga tccagtggc ggccgcaac aatgtgacca 480
 ccggctgaa gaacgccgat ggcacggcgt cgttccgtcc gctcgacacc acgcaccgcg 540
 acgcaatggc ggcgttctc taccgcctga gtga 574

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con dicha secuencia o un fragmento de la misma que induce la secreción de IL-6 o IL-10 por PBMC, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.
- 10 2. El polipéptido para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria según la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino, elegida entre la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, ileítis, reservoritis y enteritis.
- 15 3. El polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho fragmento consiste en el aminoácido 32 a 352 de la SEQ ID NO:1.
- 20 4. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.
- 25 5. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.
- 30 6. Una célula anfitriona que ha sido transfectada, infectada o transformada por una secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4 y/o un vector como se define en la reivindicación 5, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.
- 35 7. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se define en las reivindicaciones 1-3, una secuencia de ácido nucleico como se define en 4, un vector como se define en la reivindicación 5 o una célula anfitriona como se define en la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria.
9. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en donde dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del intestino.
10. Un método para la selección de bacterias que tienen propiedades inmunomoduladoras que comprende la etapa de:
 - a) Cultivar una bacteria en un medio que comprende lactato de sodio e hidrolizado de caseína,
 - b) Preparar un extracto de muestra de proteína a partir de la bacteria de la etapa a),
 - 30 c) Medir el nivel de expresión del polipéptido que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO:1 de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con dicha secuencia o un fragmento de la misma que induce la secreción de IL-6 o IL-10 por PBMC, en el extracto de muestra de proteína como se preparó en la etapa b), y
 - d) Seleccionar las bacterias que expresan dicho polipéptido como se define en la etapa c).
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en donde las concentraciones de lactato sódico e hidrolizado de caseína en el medio son respectivamente 50 mM y 5 g/l.
12. El método de la reivindicación 10, en donde el extracto de muestra de proteína de la etapa b) se obtiene incubando la bacteria cultivada en la etapa a) en una solución que comprende hidrocloreuro de guanidina.

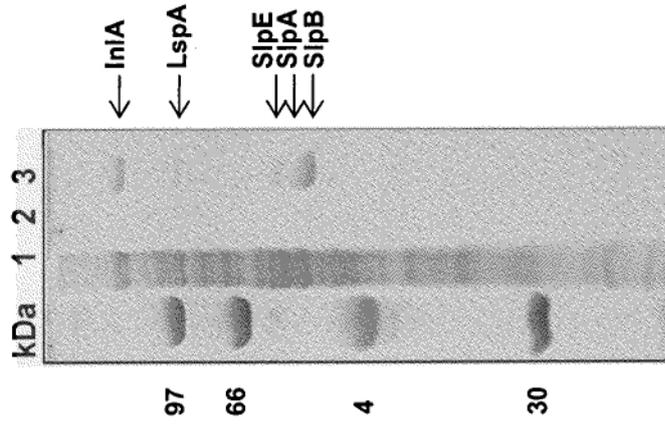


Figura 1

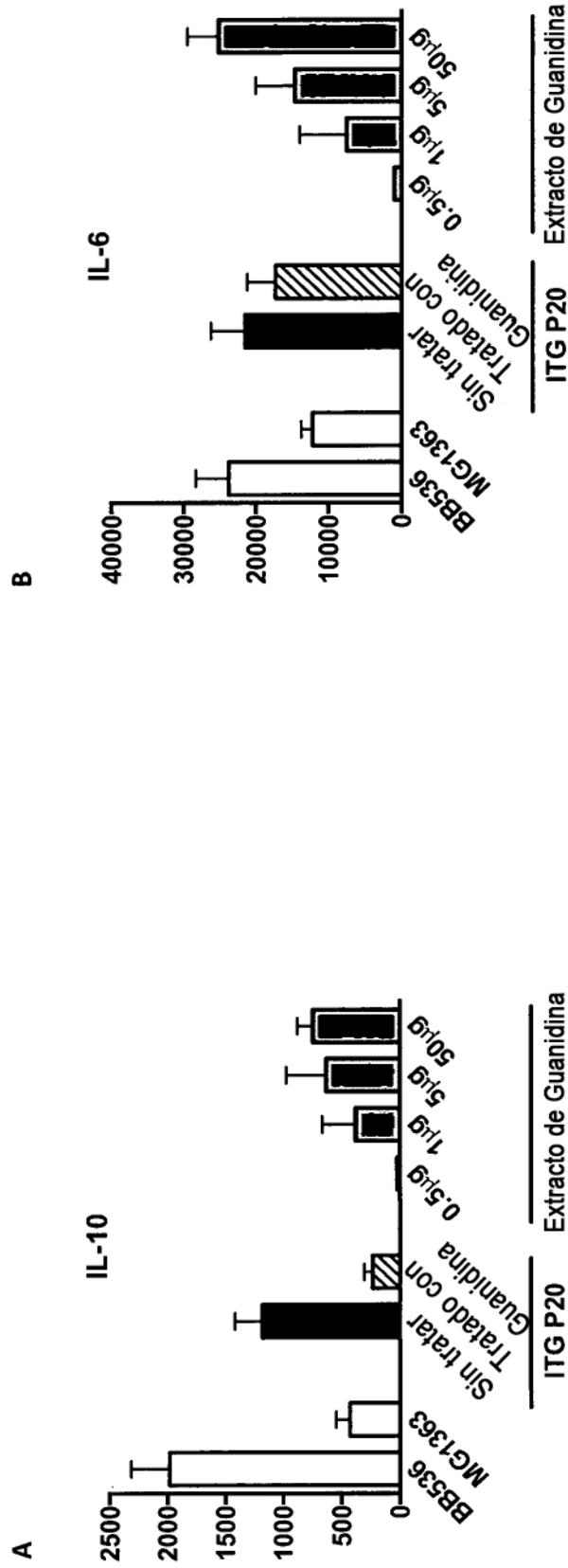


Figura 3

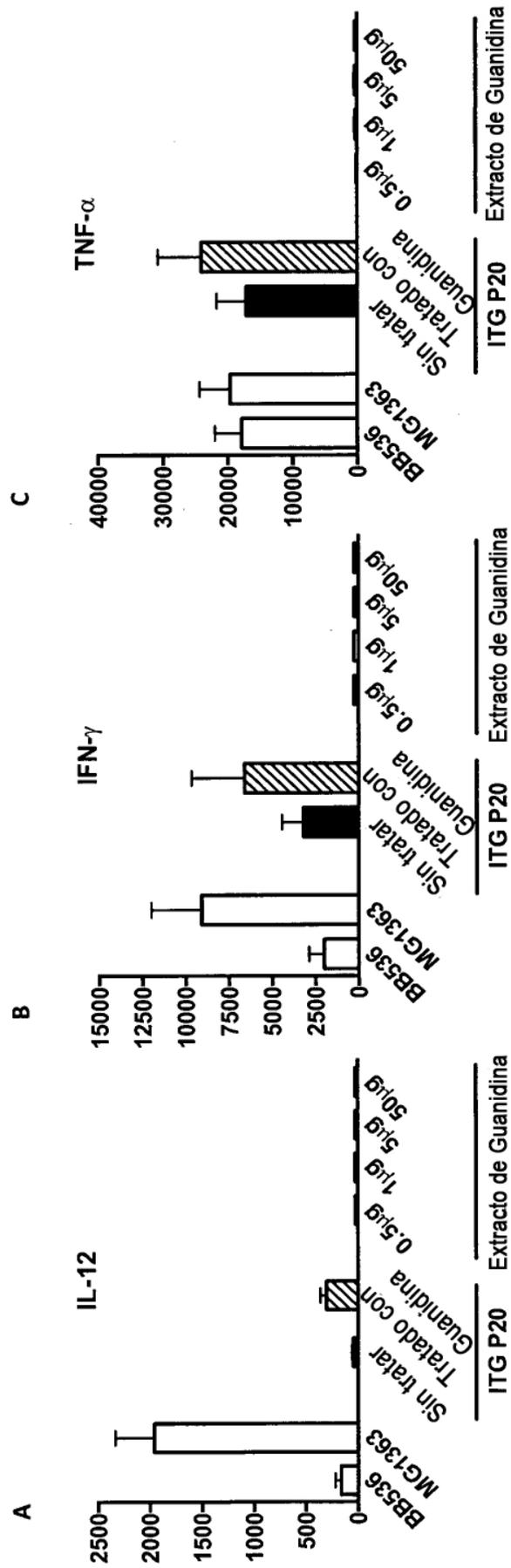


Figura 4

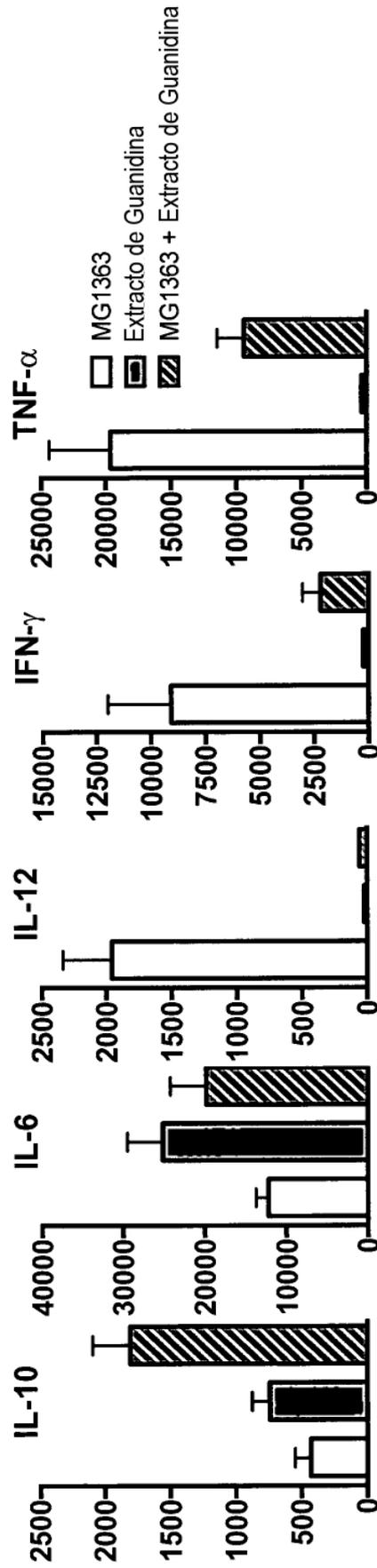


Figura 5

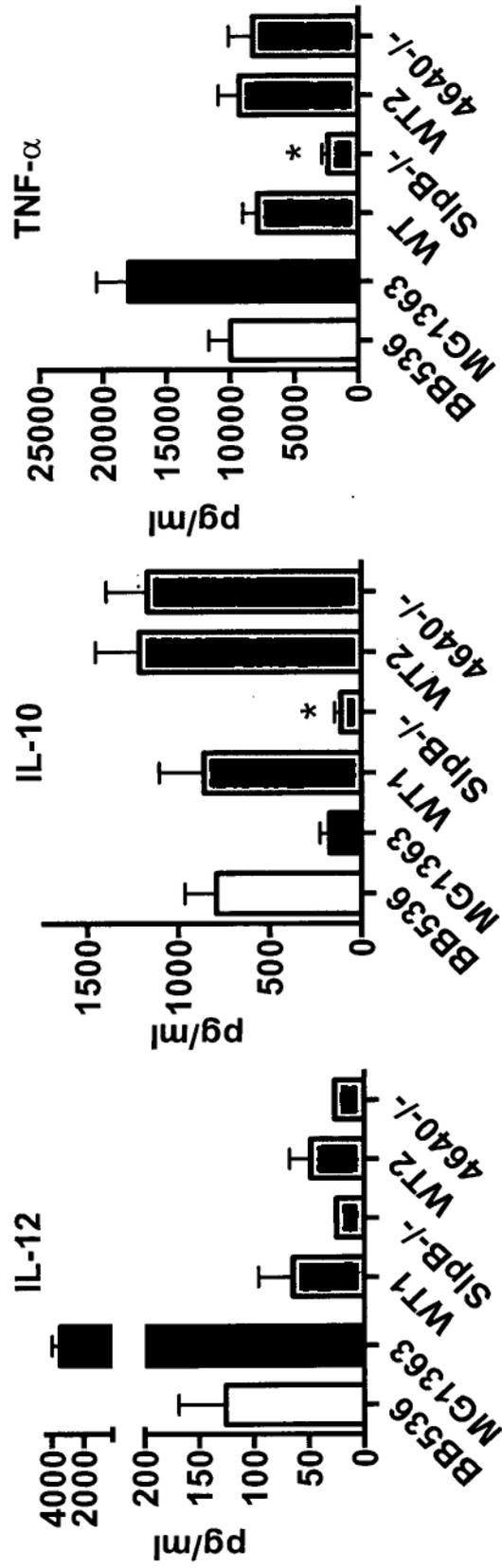


Figura 6

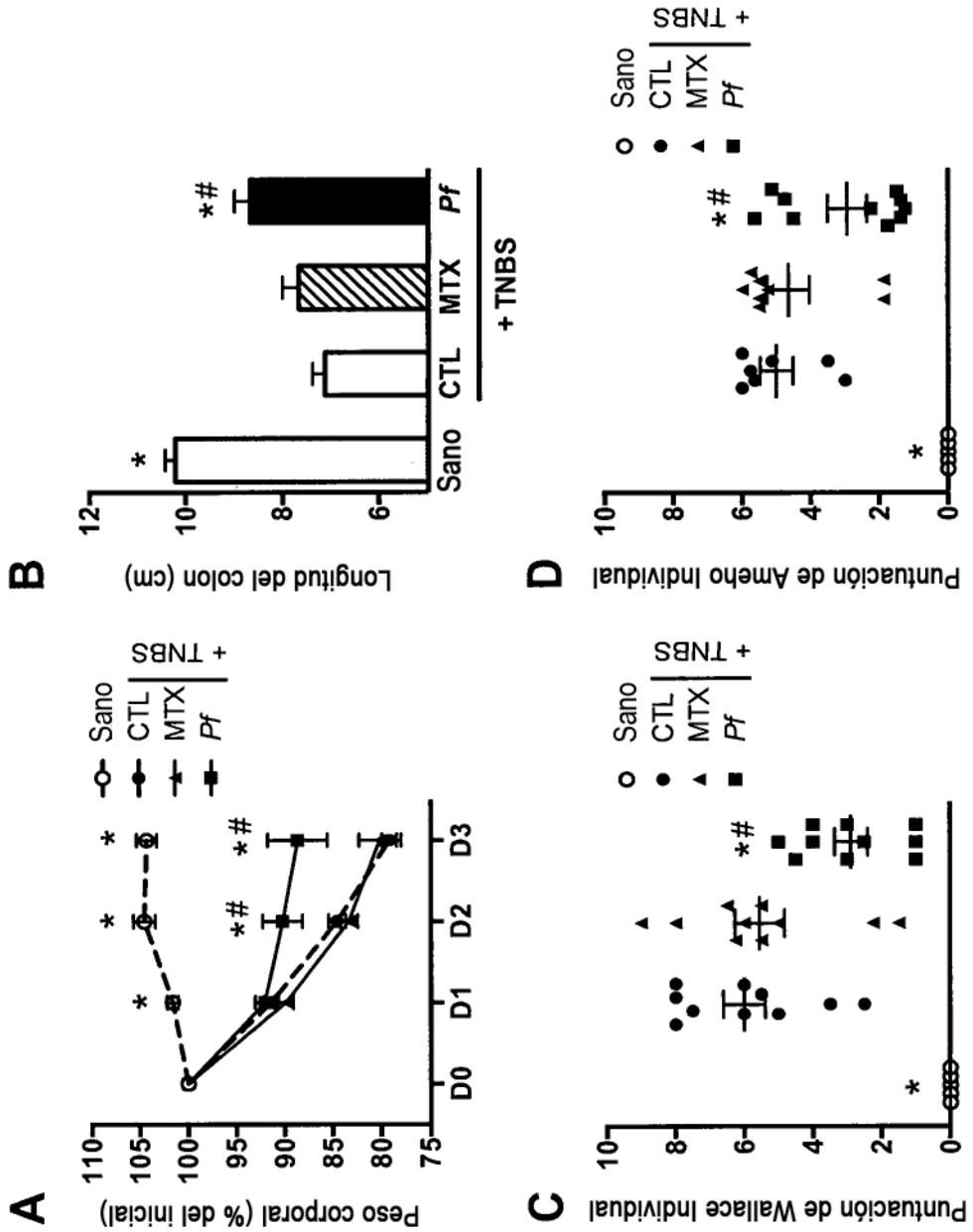


Figura 7

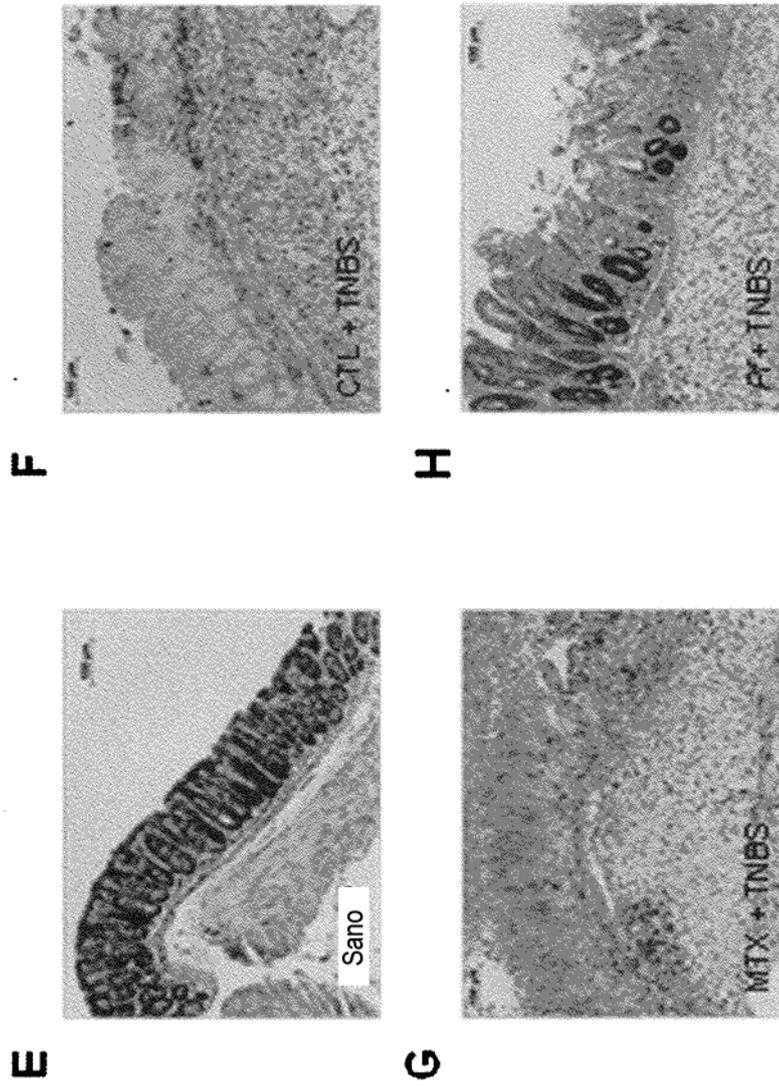


Figura 7

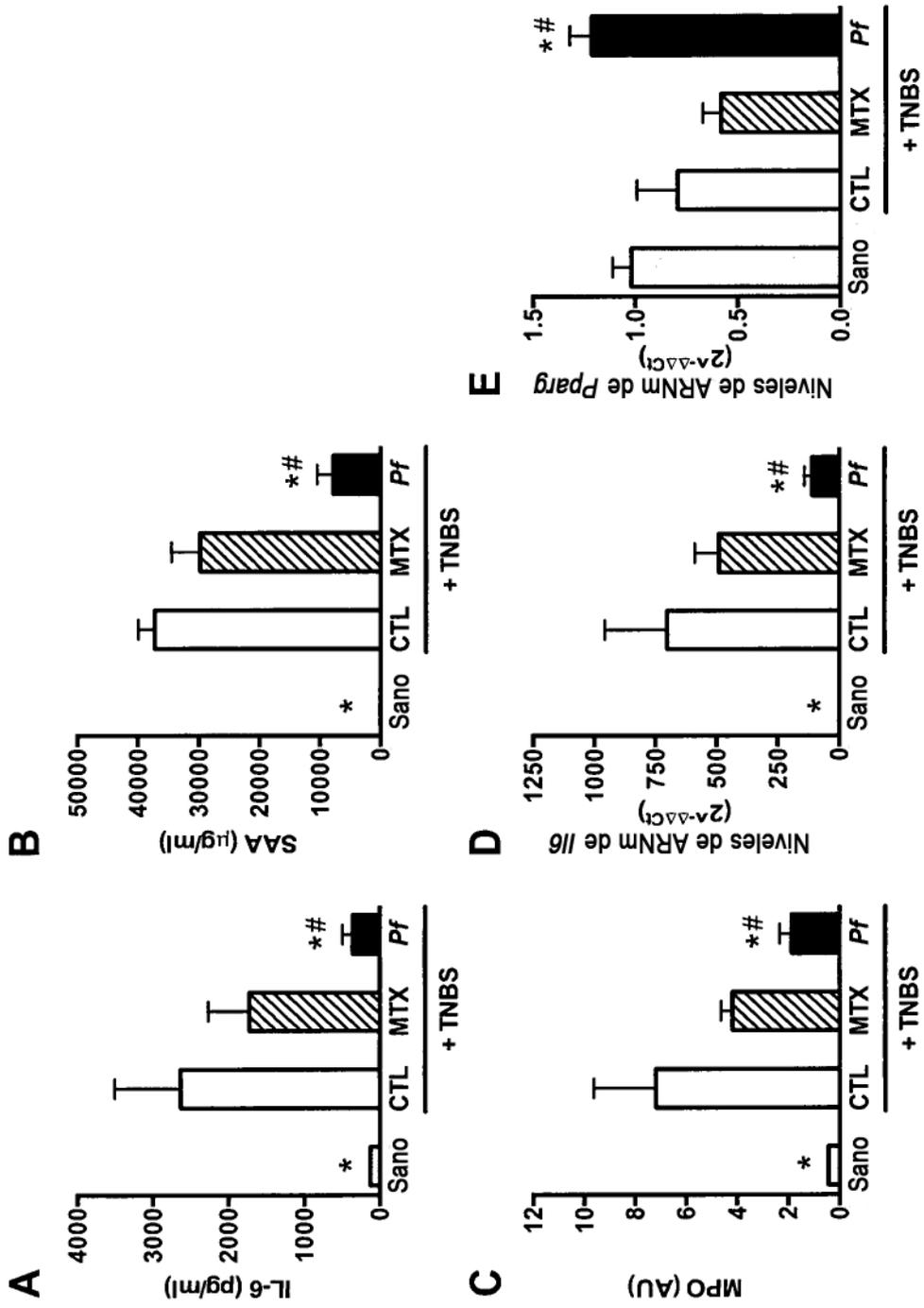


Figura 8

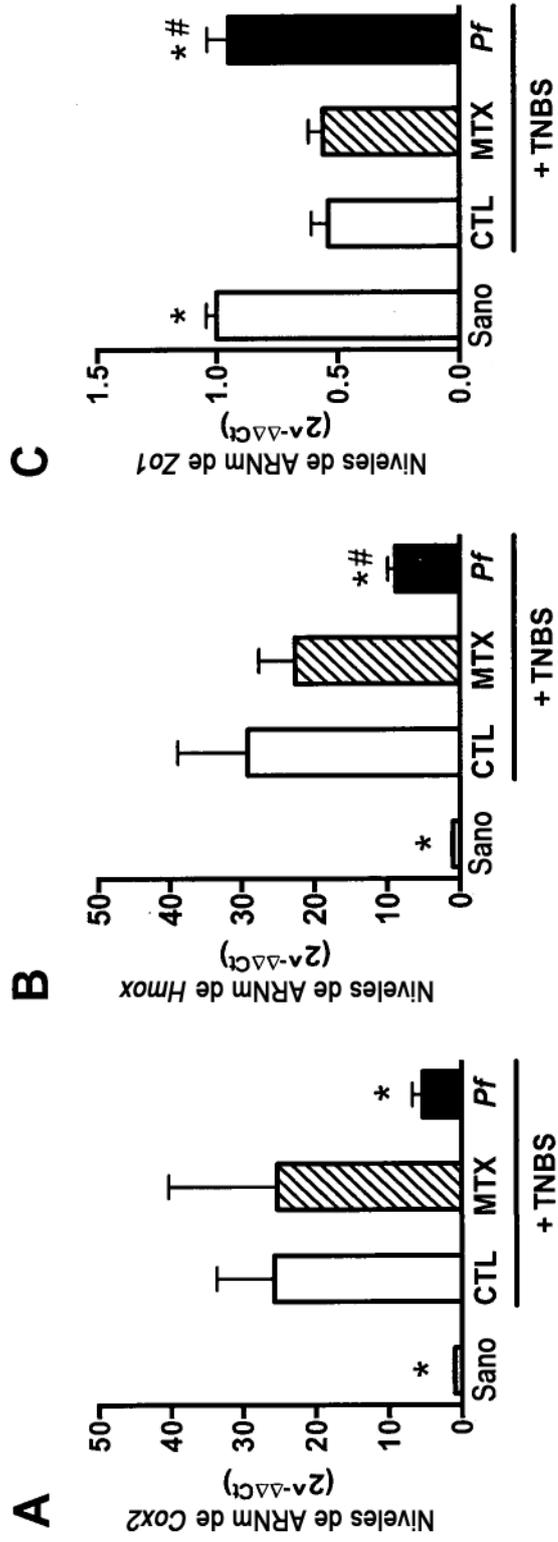


Figura 9

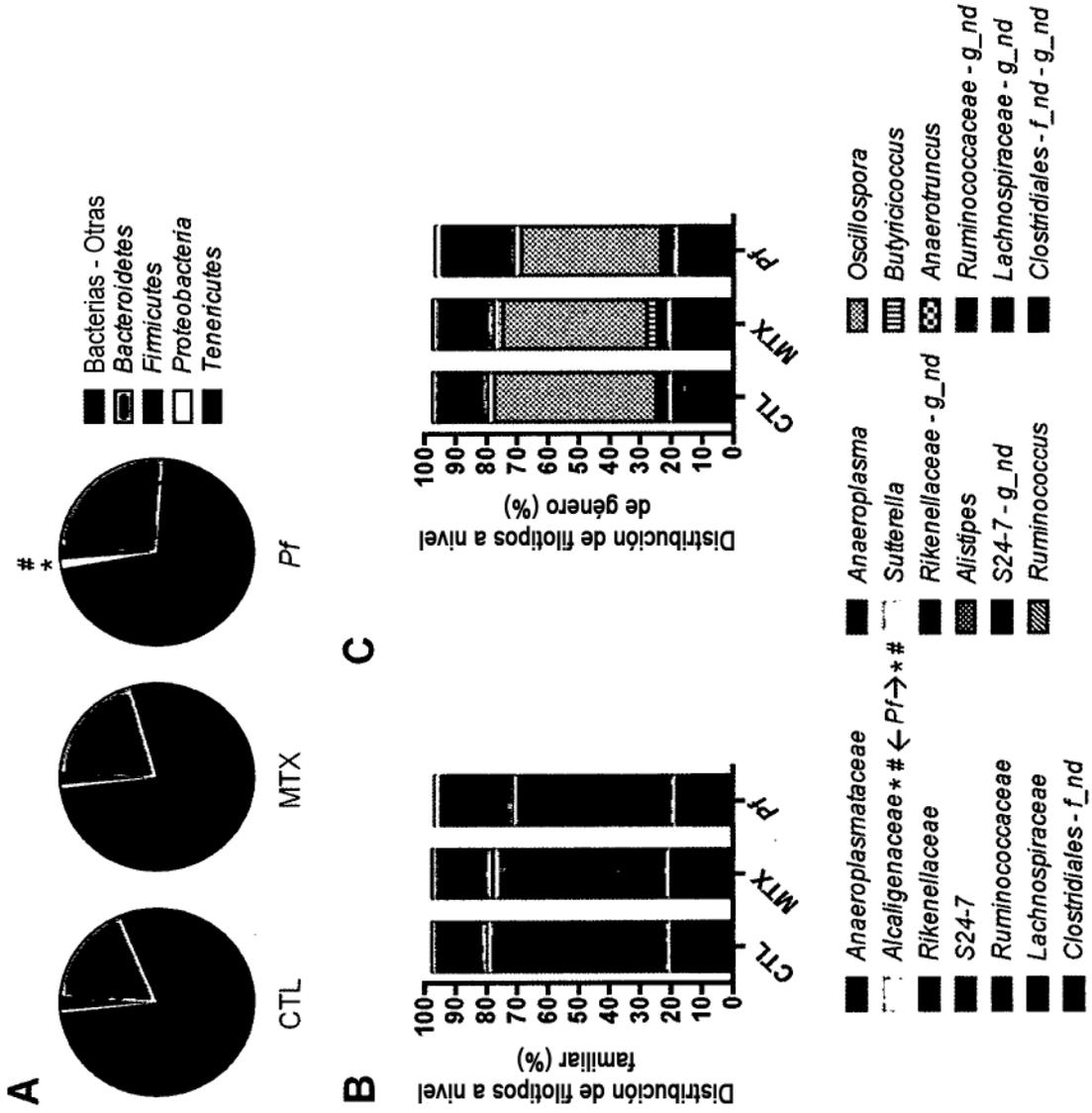


Figura 10