

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
14 de marzo de 2013 (14.03.2013) WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/034795 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

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

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2012/070643

(22) Fecha de presentación internacional:

7 de septiembre de 2012 (07.09.2012)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201131469

7 de septiembre de 2011 (07.09.2011)

ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). IMPERIAL COLLEGE LONDON [GB/GB]; North West London Hospitals Campus, Level 7W, NorthWick Park & St. Mark's Site, Watford Road, Harrow, Middlesex HA1 3UJ (GB).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): SÁNCHEZ GARCÍA, Borja [ES/ES]; Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Carretera de Infiesto, s/n, E-33300

Villaviciosa (Asturias) (ES). MARGOLLES BARROS, Abelardo [ES/ES]; Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Carretera de Infiesto, s/n, E-33300 Villaviciosa (Asturias) (ES). BERNARDO ORDIZ, David [ES/GB]; Imperial College London, North West London Hospitals Campus, Level 7W, NorthWick Park & St. Mark's Site, Watford Road, Harrow, Middlesex HA1 3UJ (GB). KNIGHT, Stella C. [GB/GB]; Imperial College London, North West London Hospitals Campus, Level 7W, NorthWick Park & St. Mark's Site, Watford Road, Harrow, Middlesex HA1 3UJ (GB). HAFID, Omar [GB/GB]; Imperial College London, North West London Hospitals Campus, Level 7W, NorthWick Park & St. Mark's Site, Watford Road, Harrow, Middlesex HA1 3UJ (GB).

(74) Mandatario: UNGRIA LÓPEZ, Javier; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

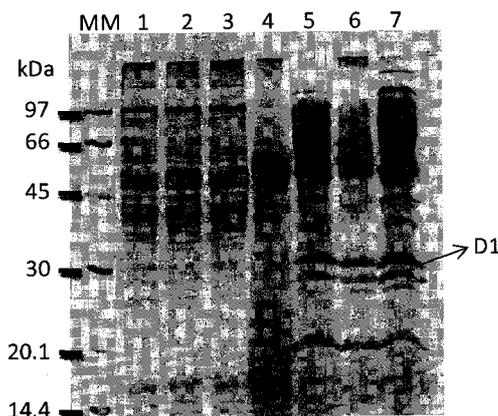
(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PEPTIDE SECRETED BY *LACTOBACILLUS PLANTARUM* WITH IMMUNOMODULATING FUNCTION

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

FIG. 1



(57) Abstract: Amongst the fewer than 10 proteins secreted in the largest amounts by the species *Lactobacillus plantarum*, is one of some 30 kDa that contains an internal fragment without cleavage points for the most important intestinal proteases, which is characterized in that it contains at least 50% serine and threonine. The genetic information encoded in this fragment, called "ST peptide", has been used to produce and to purify said peptide and thus to allow different *in-vitro* tests. Overall, the ST peptide appears to be promoting the process of immunological ignorance of our gastrointestinal immune system with respect to the bacteria found in our gastrointestinal tract, oral tolerance mechanisms thereby being promoted. Therefore, the ST peptide could be used in immunotherapy, particularly within the context of certain autoimmune diseases and certain inflammatory diseases.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]



WO 2013/034795 A1

TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

Publicada:

- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

Entre las menos de 10 proteínas secretadas de forma mayoritaria por la especie *Lactobacillus plantarum*, se encuentra una de unos 30 kDa que contiene un fragmento interno sin puntos de corte para las proteasas intestinales más importantes y caracterizado por tener un contenido en serina y treonina de, al menos, un 50 %. La información genética codificada en este fragmento, denominado péptido ST, ha sido utilizada para producir y purificar dicho péptido y así poder hacer distintos ensayos *in vitro*. En conjunto, el péptido ST estaría promoviendo el proceso de ignorancia inmunológica de nuestro sistema inmune gastrointestinal hacia las bacterias comensales de nuestro tracto gastrointestinal, favoreciéndose por tanto los mecanismos de la tolerancia oral. Por tanto el péptido ST podría ser utilizado en inmunoterapia, sobre todo en el marco de ciertas enfermedades autoinmunes y de ciertas enfermedades inflamatorias.

PEPTIDO SECRETADO POR LACTOBACILLUS PLANTARUM CON FUNCION INMUNOMODULADORA

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

15 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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

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

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

Algunas cepas pertenecientes al grupo de bacterias del ácido láctico son consideradas como probióticos, ya que son capaces de modular favorablemente la composición de la microbiota intestinal, afectando favorablemente a la salud humana (Rijkers, G.T. y cols. (2010) Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J. Nutr.* 140, 671S-676S). En los últimos años, diversos grupos de investigación han ido acumulando evidencia científica que sugiere que ciertos componentes extracelulares podrían ser responsables de algunos de los efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos. Esto cobra más sentido si se tiene en cuenta que en condiciones

normales, en los individuos sanos la microbiota no se encuentra en contacto directo con la capa de enterocitos y/o las CDs. Por el contrario la microbiota se encuentra embebida en la capa de mucus protectora que recubre la capa epitelial del intestino. Es por tanto factible que dichos efectos beneficiosos de los probióticos no se deban a la interacción directa de las bacterias con las CDs. Por el contrario los probióticos podrían ejercer su función produciendo ciertos componentes que sí puedan atravesar la capa de mucus facilitando su captación por las CDs. Entre estos componentes extracelulares podemos mencionar los exopolisacáridos, los ácidos teicoicos, los indoles y las proteínas de superficie y extracelulares (Lebeer y cols. (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 171-84). Estas últimas se definen como el grupo de proteínas que son secretadas durante el crecimiento bacteriano y que son liberadas al medio que las rodea (Sánchez y cols. (2008) Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 54, 1-17). Actualmente, las proteínas extracelulares constituyen un campo de investigación activa para la identificación y caracterización de los mecanismos moleculares de acción de los probióticos.

Las proteínas extracelulares pueden ser divididas en dos grupos principales. El primero está compuesto por aquellas proteínas que tienen un péptido señal, localizado en su parte N-terminal, y que dirige a la pre-proteína a la maquinaria de secreción, a través de la cuál es secretada al medio. El segundo grupo comprende aquellas proteínas que, además de un péptido señal, tienen dominios de unión a la superficie celular, siendo liberadas al medio durante el proceso de renovación de la pared bacteriana. Por último, algunos autores identifican un tercer grupo de proteínas extracelulares, compuesto por proteínas del metabolismo central, sin dominios de secreción, y para las cuales se desconoce el mecanismo responsable de su secreción al exterior celular.

Los sistemas de secreción de proteínas están altamente conservados dentro de la división Eubacteria. Dichos sistemas están particularmente bien caracterizados en bacterias Gram negativas, donde al menos se distinguen siete sistemas (tipos 1-6 y el sistema de las "argininas gemelas") (Sibbald y van Dijk (2009) Bacterial secreted

proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis. Ed. Wooldridge, Caister Academic Press). En bacterias Gram positivas, grupo taxonómico que comprende a la mayor parte de cepas probióticas, las proteínas extracelulares serían exportadas por sistemas análogos.

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

Estos trabajos son solamente ejemplos de cómo el proceso de comunicación intercelular entre bacterias y células inmunes del sistema innato, mediaría una serie de respuestas fisiológicas dirigidas a regular la homeostasis inmunológica de nuestra mucosa intestinal, y por ende de nuestro organismo. Parte de este proceso, como

25 muestran los resultados descritos en la presente invención, podrían estar mediados por péptidos codificados en el interior de las principales proteínas secretadas por las bacterias del ácido láctico presentes en nuestro tracto gastrointestinal.

Con respecto a patentes similares disponibles en las bases de datos, podemos citar

30 la patente EP95900421.9 la cual tiene como objeto de protección unas composiciones que se unen específicamente a células cancerosas colorrectales y procedimiento de uso de las mismas. En este documento se describe el uso de otros

péptidos ST, en este caso derivados de una toxina termoestable producida por una cepa de la bacteria *Escherichia coli*, cuya secuencias no corresponden con la secuencia del péptido descrito en esta invención. . Aunque este documento define los “péptidos ST” como los péptidos de unión a receptor de ST de entre 13 y 25 aminoácidos, estos péptidos proceden de *E. coli* y se encuentran comprendidos en compuestos conjugados, los cuales también comprenden un resto activo radioestable, para ser capaces de dirigirse específicamente a células de cáncer colorrectal metastatizadas.

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

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

25 DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

En esta invención se describe la secuencia del péptido ST, codificado dentro de una de las proteínas secretadas por una bacteria del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus plantarum* (hasta la fecha sin función conocida), dicho péptido de 30 kDa contiene un fragmento sin puntos de corte para las proteasas intestinales más importantes. También se caracteriza por tener un contenido en serina y treonina de, al menos, un 50%. Si este péptido es puesto en contacto con CDs obtenidas tanto de sangre como de biopsias intestinales humanas, es capaz de modularlas hacia un

fenotipo regulador donde se bloquea la producción de IL-12 (interleuquina pro-inflamatoria característica de células presentadoras de antígenos) y se expande la producción de IL-10 (citocina anti-inflamatoria a través del bloqueo de la síntesis de citocina pro-inflamatorias por parte de otros tipos celulares inmunes, como los
5 linfocitos T). Dichas CD tratadas con el péptido ST adquieren asimismo una funcionalidad diferente ya que los linfocitos T que estimulan adquieren un perfil migrador preferencialmente dirigido a la piel con un perfil de citocinas no pro-inflamatorio. Este mecanismo de acción contribuye activamente al mantenimiento de la homeostasis intestinal no primando los mecanismos de la tolerancia inmunológica
10 sino por el contrario de la ignorancia inmunológica. Así, las CDs maduras con el péptido ST en el intestino favorecen la migración secundaria de las células efectoras (linfocitos T) a la piel impidiendo por tanto el establecimiento de una respuesta inmune activa frente a la flora comensal en el tracto gastrointestinal.

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

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

- 30 a) es secretado por una bacteria del género *Lactobacillus*,
b) su secuencia aminoacídica tiene un contenido de entre el 30-60% de los aminoácidos serina y treonina, y
c) comprende un fragmento de al menos 30 kDa sin puntos de corte para al

menos una proteasa intestinal.

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

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

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

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

En una realización preferente de la presente invención, dicho péptido ST se caracteriza porque su secuencia aminoacídica tiene al menos entre un 80 - 100% de

homología con SEQ ID No: 1. Preferentemente dicho péptido ST se caracteriza porque su secuencia aminoacídica tiene un 95% de homología con SEQ ID No: 1. Más preferentemente dicho péptido ST se caracteriza porque su secuencia aminoacídica es SEQ ID No: 1, o su ortólogo.

5

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

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

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

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

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

En la presente invención el término “tolerancia inmunológica” se refiere al conjunto
30 de procesos inducidos por el que los cuales el sistema inmune no responde frente a un antígeno, propio o extraño.

En la presente invención, el término “ignorancia inmunológica” se refiere a su

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

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

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

15

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

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

En una realización preferente de la presente invención dichas propiedades inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias se manifiestan respectivamente porque la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST comprende:

- a) inducir en las células dendríticas de dicho paciente la producción de una citoquina anti-inflamatoria y homeostática, preferentemente interleuquina 10 (IL-10), y/o
- b) bloquear en las células dendríticas de dicho paciente la producción de una citoquina pro-inflamatoria, preferentemente pro-inflamatoria interleuquina 12 (IL-12), cuando ésta se encuentra presente, además de otras citoquinas pro-

inflamatorias como la IL-6, con una alta relevancia en enfermedad inflamatoria intestinal.

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

- a) adquieren un perfil de migración a piel, y/o
- b) adquieren un perfil de producción de citoquinas no pro-inflamatorias.

10 Preferentemente el perfil de migración a piel definido en a) comprende un descenso en la expresión del marcador de migración a mucosa intestinal integrina $\beta 7$ y un aumento en la expresión del marcador de migración a piel CLA. Preferentemente el perfil de producción de citoquinas no pro-inflamatorias definido en b) comprende un
15 descenso en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias IFN γ e interleuquina 17 (IL-17).

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

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

25

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

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

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

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

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

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

15

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

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

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

Fig.5. a) Producción de marcadores de migración a mucosa intestinal (integrina $\beta 7$) y a piel (CLA) en células dendríticas enriquecidas a partir de sangre humana (LDCs). Las condiciones testadas fueron las basales (ausencia de señalización), 0.0, 0.1, 1.0 o 10 microgramos/mililitro del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1. b) el

ensayo realizado con este péptido no modifica ni los marcadores de migración a tejidos ($\beta 7$ y CLA), ni las moléculas del MHC de tipo II (HLA-DR) ni ciertas moléculas co-estimuladoras (CD40) o de activación (CD83) en células dendríticas enriquecidas de sangre humana. El estímulo con lipopolisacárido (LPS) fue usado como un control
5 de una estimulación con un componente bacteriano pro-inflamatorio.

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

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

Fig.8. De izquierda a derecha, representaciones obtenidas mediante citometría de flujo que representa poblaciones de células T estimuladas con células dendríticas
20 alogénicas. Panel izquierdo: detección de células viables mediante la técnica "forward side scatter". Panel central: identificación del marcador CD3. Panel derecho: las células T estimuladas fueron identificadas por perder la tinción para CFSE derivada de la división celular.

25 **Fig.9.** Diagramas de citometría de flujo que representan cambios inducidos en células T estimuladas por células dendríticas enriquecidas de sangre (LDC) y expuestas al péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (LDC BP) o a lipopolisacárido (LPS LDC). En todos los casos se comparó con los cambios producidos en las células T en reposo (resting T-cells), y con la utilización de LDCs
30 no estimuladas (basal LDC). A) Cambios en los niveles del marcador de migración a mucosa intestinal integrina $\beta 7$ inducido por distintas concentraciones del péptido ST

identificado como SEQ ID NO: 1 (BP LDC) y de lipopolisacárido (LPS LDC). B) Cambios en los niveles del marcador de migración a piel CLA inducido por distintas concentraciones del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (BP LDC) y de lipopolisacárido (LPS LDC). C) Representación de los resultados mediante
5 histograma de barras de 3 experimentos independientes.

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

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

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

25

Fig.13. Diagramas de citometría de flujo que representan cambios en la producción de los marcadores de migración β 7 (mucosa intestinal) y CLA (mucosa epitelial) en linfocitos T estimulados con células dendríticas enriquecidas a partir de biopsias de colon (gut DC) en ausencia de estimulación (basal gut DC) (panel central) o
30 pulsadas previamente con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 (peptide

gut DC) (panel inferior). El panel superior representa la producción de los mismos marcadores de migración en células T en reposo (resting T cells).

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

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

10

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

EJEMPLOS

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

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

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

Actualmente, existe un creciente interés en el estudio de las proteínas secretadas
por bacterias probióticas, al ser éstas potenciales mediadores de la comunicación
25 intercelular entre bacterias y células del sistema inmune del hospedador. Como
puede verse en la figura 1, en la que se muestran las principales proteínas
secretadas por *Lb. plantarum* NCIMB 8826, *Lb. plantarum* 299v y *Lb. plantarum*
BMCM12 (calles 5, 6 y 7), existe una relativa similitud entre las proteínas secretadas
por diferentes miembros de la especie *Lb. plantarum*. La secuencia del péptido ST,
30 cuya secuencia se muestra en la figura 2 identificada como SEQ ID No: 1, deriva de
la zona central de la proteína denominada D1 (Número de identificador del GenBank
gi|28270057) identificada como SEQ ID No: 2, con algunas modificaciones e

inclusiones de aminoácidos que aparecen subrayadas en la SEQ ID NO: 1 (figura 2). Esta zona se caracteriza por su riqueza en los aminoácidos serina y treonina, de la que deriva su nombre, y se caracteriza por la ausencia de puntos de corte para algunas de las proteasas más importantes del tracto gastrointestinal (pepsina, tripsina y quimotripsina) (figura 3).

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 1, producido en el ambiente intestinal o ingerido a través de los alimentos, podría interactuar con las CDs de la mucosa intestinal, afectando así a la función inmune.

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

1.1. Material y métodos

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

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

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

10

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

20

Tinción intracelular de citocinas.

Las CDs fueron cultivadas durante 4 horas en presencia/ausencia de monensina.
Posteriormente fueron teñidas para los marcadores de superficie como se describió
previamente. A continuación fueron fijadas con LeucopermA, y permeabilizadas con
25 LeucopermB antes de añadir los anticuerpos de tinción intracelular. Tras la
incubación las CDs se lavaron en buffer FACS, se fijaron y fueron adquiridas como
se describió previamente. El análisis se realizó mediante la substracción SED
detallada previamente donde el histograma de cada citocina de las CDs que no
habían sido incubadas con monensina se restaron del histograma de cada citocina
30 de las CDs que había sido incubadas en ausencia de monensina. Este protocolo ha
sido ampliamente validado por nuestros colaboradores (Hart y cols., (2005)
Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases.

Gastroenterology. 129, 50-65) y permite cuantificar cambios en la producción natural de citocinas por parte de las CDs en ausencia de estímulos externos como PMA y/o ionomicina. Mediante este abordaje no se determina el contenido intracelular de cada citocina. Por el contrario se determinan los cambios inducidos en la producción
5 de citocinas en una ventana temporal de 4 horas (el tiempo de incubación con monensina) independientemente del contenido inicial de citocinas.

1.2.Resultados

Como puede verse en la figura 5 (panel A), el péptido ST identificado como SEQ ID
10 NO: 1 no produjo cambios en los marcadores de migración de las CDs enriquecidas de sangre periférica (Integrina β 7, marcador de mucosa intestinal y CLA, marcador de piel). El péptido tampoco produjo cambios ni en la inducción de moléculas MHC de tipo II (HLA-DR) ni de ciertas moléculas co-estimuladoras (CD40) o de activación (CD83) (figura 5, panel B). Como puede apreciarse en ésta última, el LPS (control
15 positivo) sí indujo una sobre-expresión en todas ellas.

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

25 Como conclusión, la presencia del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 en células dendríticas enriquecidas a partir de sangre humana (LDCs), hace que éstas adquieran un perfil de producción de citoquinas regulador, reduciendo la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 y aumentando la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. La reducción en la síntesis de IL-6, con la consecuente
30 reducción teórica en la síntesis de células T tipo Th17, es también interesante puesto que en el marco de ciertas enfermedades autoinmunes e inflamatorias se observa un

aumento de este tipo celular (Stockinger y Veldhoen (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 281–286).

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

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

10 **2.1. Material y métodos**

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

DR+ y CD3-CD14-CD16-CD19-CD34- (Hart y cols. (2005) Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 129, 50-65).

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

2.2 Resultados

Utilizando el modelo de CDs intestinales, pudo confirmarse los dos puntos más interesantes descritos en el ejemplo 1, el incremento de la producción de IL-10 y el no incremento en la producción de IL-12. En este punto ha de tenerse en cuenta que, las CDs aisladas de la mucosa intestinal de individuos sanos presentan niveles de producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 muy bajos (figura 7).

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

3.1. Material y métodos

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

Las células T se marcaron con éster de 5-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE, Invitrogen Ltd, UK) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células T así marcadas (4×10^5 células por pocillo), se incubaron durante 5 días con CDs al 0, 1, 2 o 3% en placas de microtítulo con fondo en forma de U. Las células T

en proliferación fueron identificadas y cuantificadas mediante citometría de flujo como aquellas que contenían poca cantidad de CFSE (CFSE^{low}) (Figura 8).

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

5

3.2.Resultados

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

15 A pesar de ello, las CDs incubadas previamente con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1 o con el LPS (control positivo), indujeron siempre el mismo perfil de producción de citoquinas y de marcadores de “*homing*” en las células T de los diferentes donantes. Centrándonos en las CDs incubadas con el péptido ST
20 identificado como SEQ ID NO: 1, éstas indujeron en los linfocitos T un descenso en el marcador de migración a mucosa intestinal integrina β 7, mientras que, en cambio, aumentó considerablemente la cantidad de marcador CLA (marcador de migración a piel) (Figura 9). Por tanto, las CDs enriquecidas de sangre incubadas en presencia del péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1, imprimen en los linfocitos T
25 marcadores de migración a piel. Desde un punto de vista inmunológico esto puede interpretarse como un mecanismo de ignorancia inmune a los antígenos presentes en el tracto gastrointestinal. En este sentido, las células T, una vez en la piel, nunca encontrarían el antígeno contra el que han sido seleccionadas en la mucosa intestinal, siendo por tanto inactivas.

Además, el perfil de producción de citoquinas en estas mismas células T (co-
30 incubadas con DCs que previamente habían sido incubadas con el péptido ST identificado como SEQ ID NO: 1), difirió en el sentido de que tanto la producción de

IFN γ como la de IL-17 disminuyó (figuras 10 y 11). Ambas citoquinas son pro-inflamatorias y, en el caso de la IL-17 (células Th17), se sabe que su producción por parte de las células T es mayor en de ciertas enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

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

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

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

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

25

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

Uno de los donantes que consintió por escrito a donar una biopsia de su mucosa
30 intestinal del colon para nuestros experimentos, presentaba unas CDs que

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un péptido ST con propiedades inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias, caracterizado por que:
 - 5 a) es segregado por una bacteria *Lactobacillus*,
 - b) su secuencia aminoacídica tiene al menos un 80% de homología con SEQ ID No: 1.
2. El péptido según la reivindicación 1, caracterizado por que la bacteria
10 *Lactobacillus* es *Lactobacillus plantarum*.
3. El péptido según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que la cepa de *Lactobacillus plantarum* se selecciona de entre el siguiente grupo: *Lb. plantarum* NCIMB 8826, *Lb. plantarum* 299V, y *Lb. plantarum* BMCM12.
15
4. El péptido según las reivindicaciones 1 y 3, caracterizado por que su secuencia aminoacídica tiene al menos entre un 90 - 100% de homología con SEQ ID No: 1.
- 20 5. El péptido según las reivindicaciones 1 - 4, caracterizado porque su secuencia aminoacídica es SEQ ID No: 1, o su ortólogo.
6. Uso del péptido definido en las reivindicaciones 1 - 5, para preparar un medicamento o una composición farmacéutica.
- 25 7. El uso según la reivindicación 6, caracterizado por que el medicamento o la composición farmacéutica es para el tratamiento y/o prevención de una afección intestinal.
8. El uso según la reivindicación 7, caracterizado por que la afección intestinal
30 es una enfermedad inflamatoria seleccionada entre una enfermedad inflamatoria intestinal, o una inflamación celiaca.

9. El uso según la reivindicación 8, caracterizado por que la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona entre el siguiente grupo: la enfermedad de Chron, la colitis ulcerosa y la pouchitis.
- 5 10. El uso según la reivindicación 7, caracterizado porque la afección intestinal está provocada por una enfermedad autoinmune o una enfermedad causada por la des-regulación en la composición de la microbiota intestinal.
- 10 11. Uso del péptido ST definido en las reivindicaciones 1 – 5 en la preparación de un alimento funcional.
11. Un alimento funcional caracterizado por comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST definido en las reivindicaciones 1 – 5.
- 15 12. Una composición farmacéutica o medicamento caracterizado por comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido ST definido en las reivindicaciones 1 – 5.
- 20 13. Uso del péptido ST definido en las reivindicaciones 1 – 6 para la preparación de un cosmético.
14. Un cosmético caracterizado por comprender una cantidad eficaz del péptido ST definido en las reivindicaciones 1 – 5.

FIG. 1

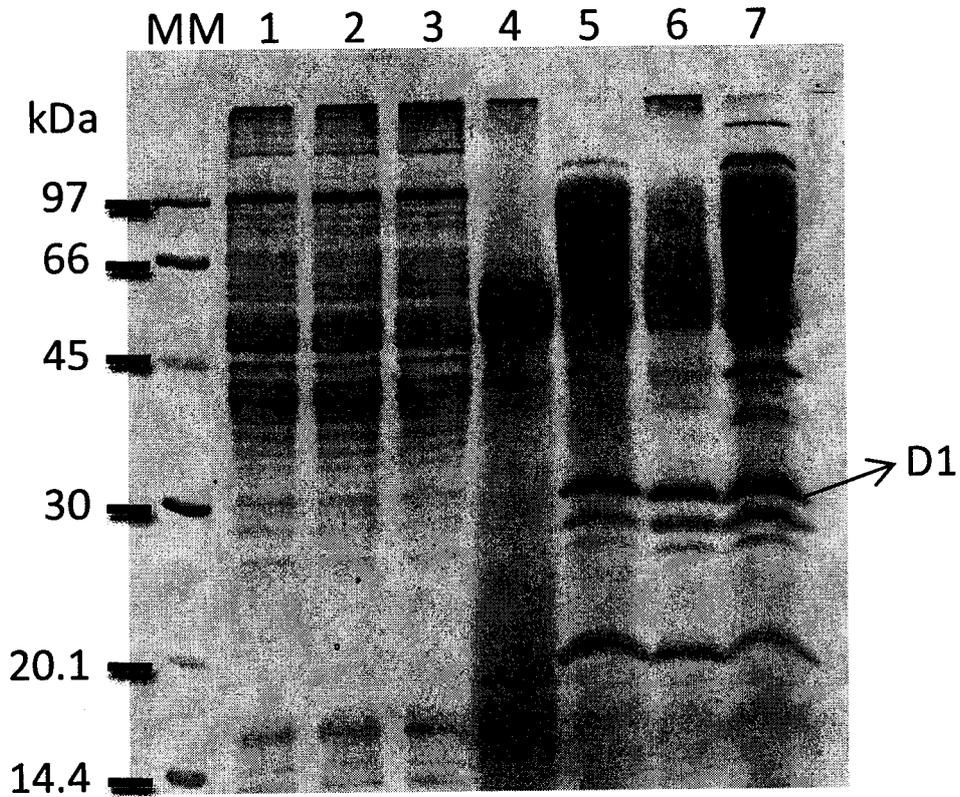
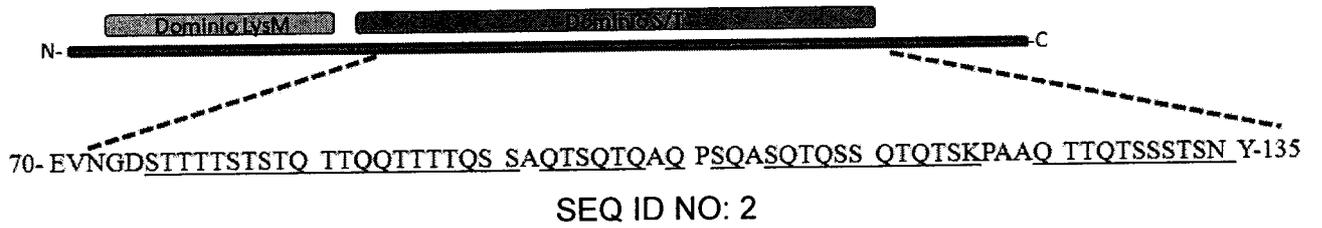


FIG. 2

A.

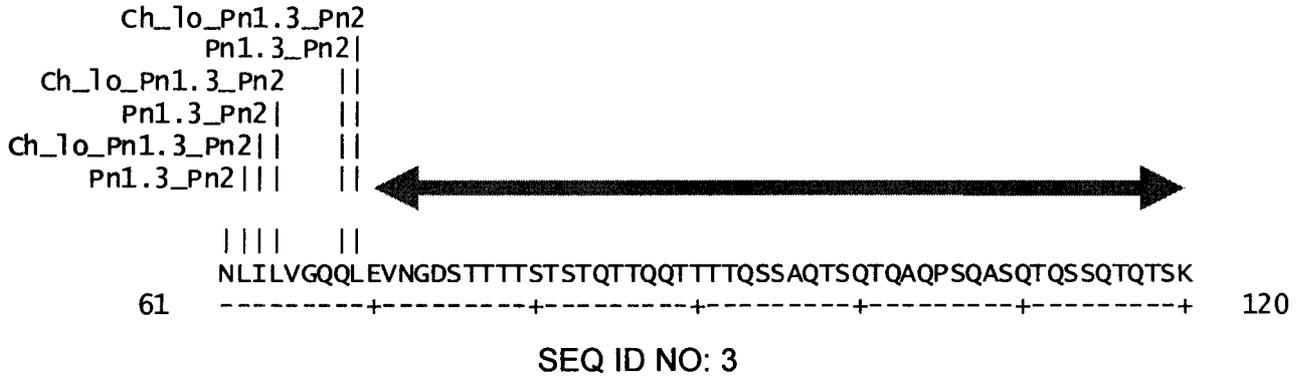


B.

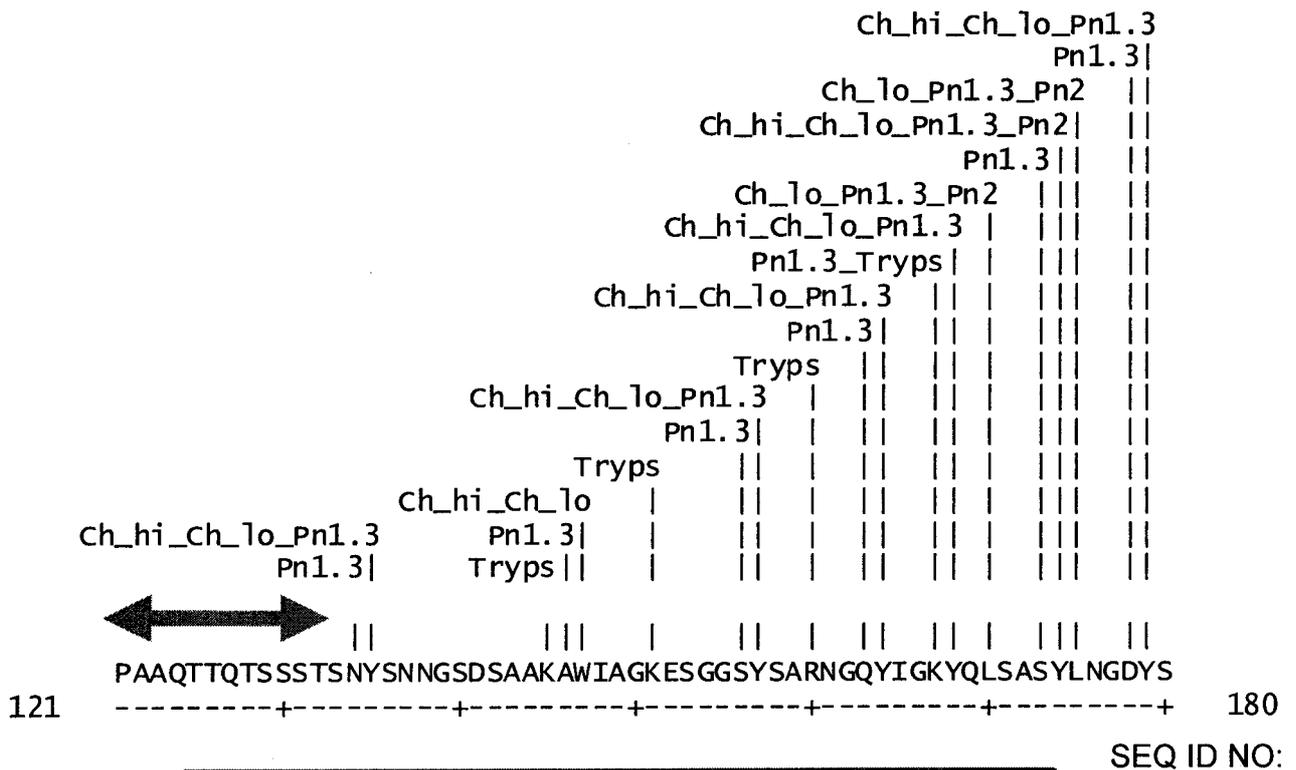
Péptido ST
GEVDGDSTTTTSTSTQTTTQTTTQSSAQTSQTQAQPSQASQTQSSQTQTSKPAAQTTQTSSSTSNYHHHHHH
 SEQ ID NO: 1

FIG. 3

A.



B.



ABREVIATURAS

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

FIG. 4

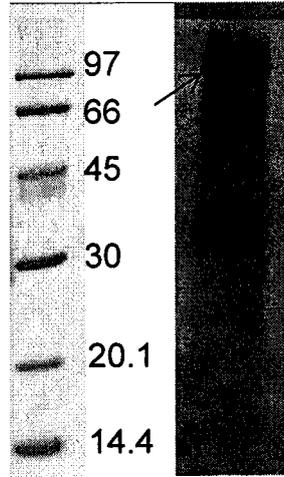


FIG. 5

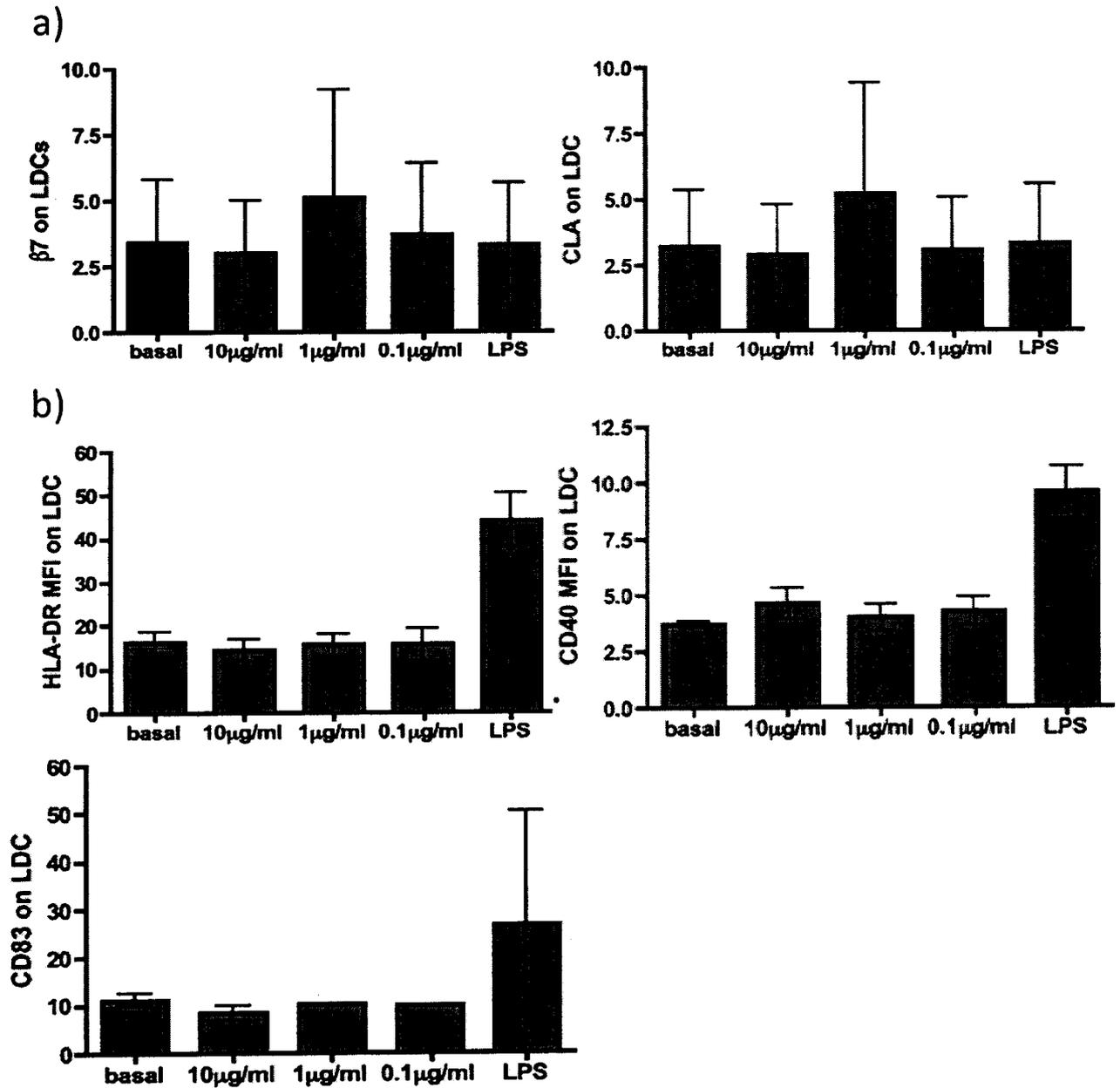


FIG. 6

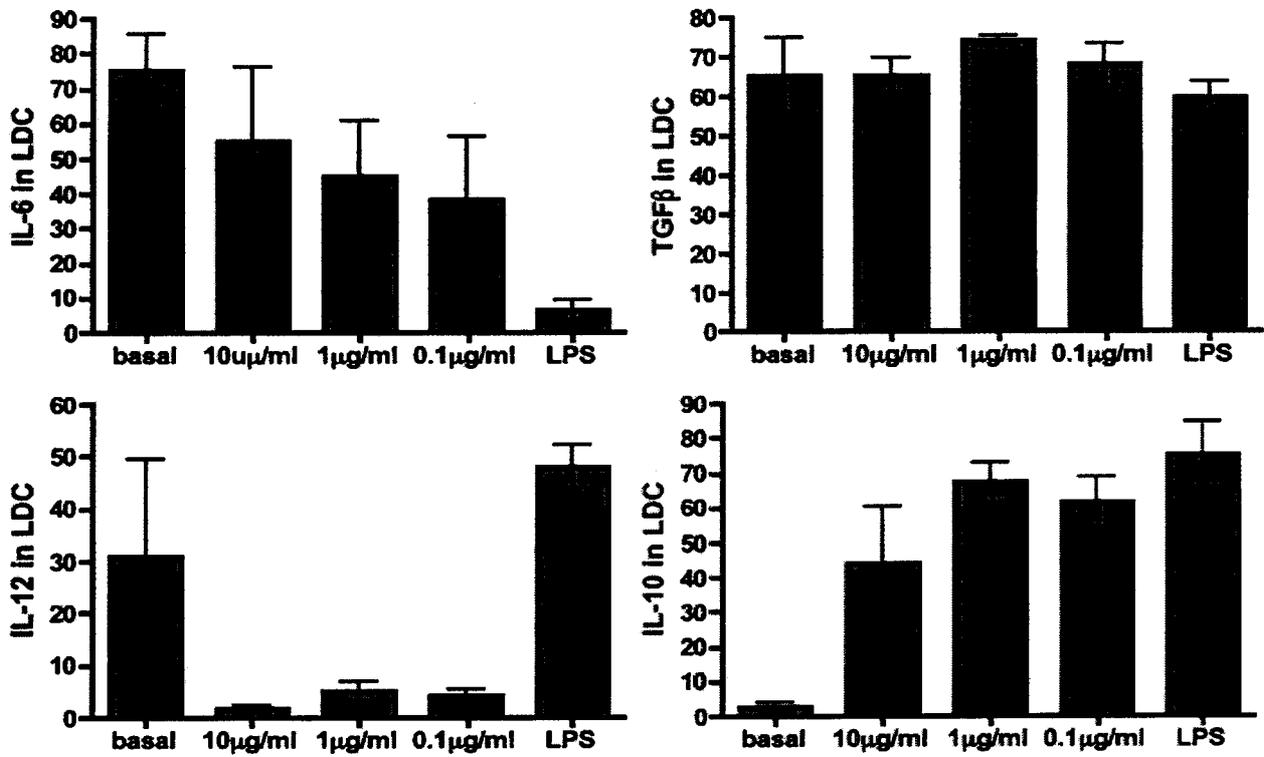


FIG. 7

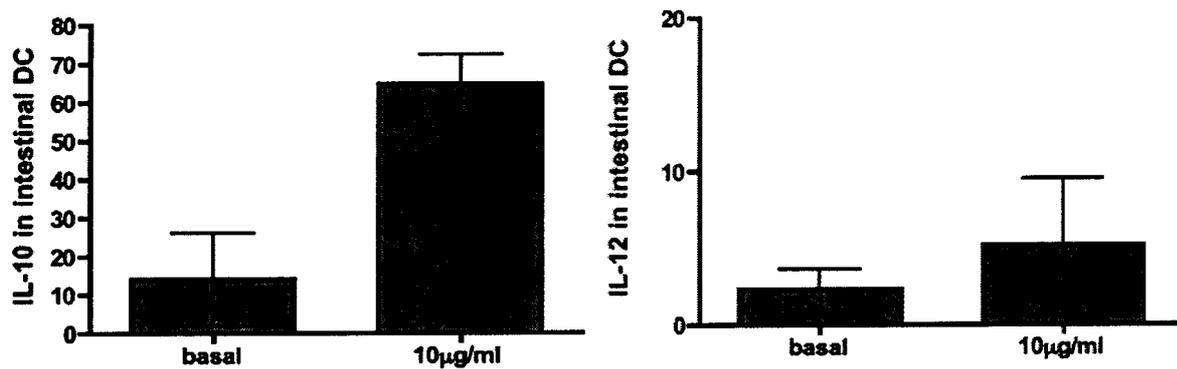


FIG. 8

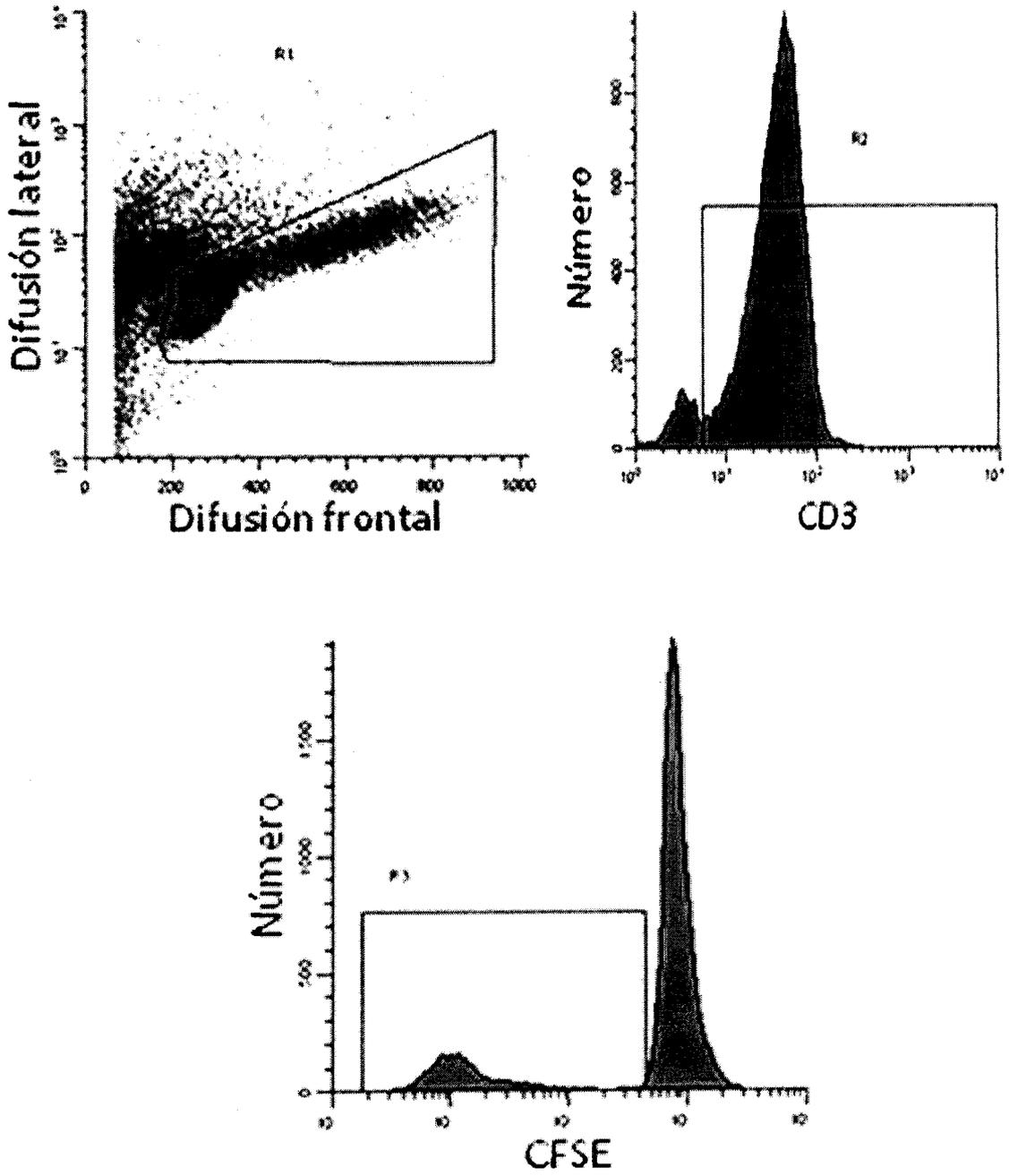


FIG. 9

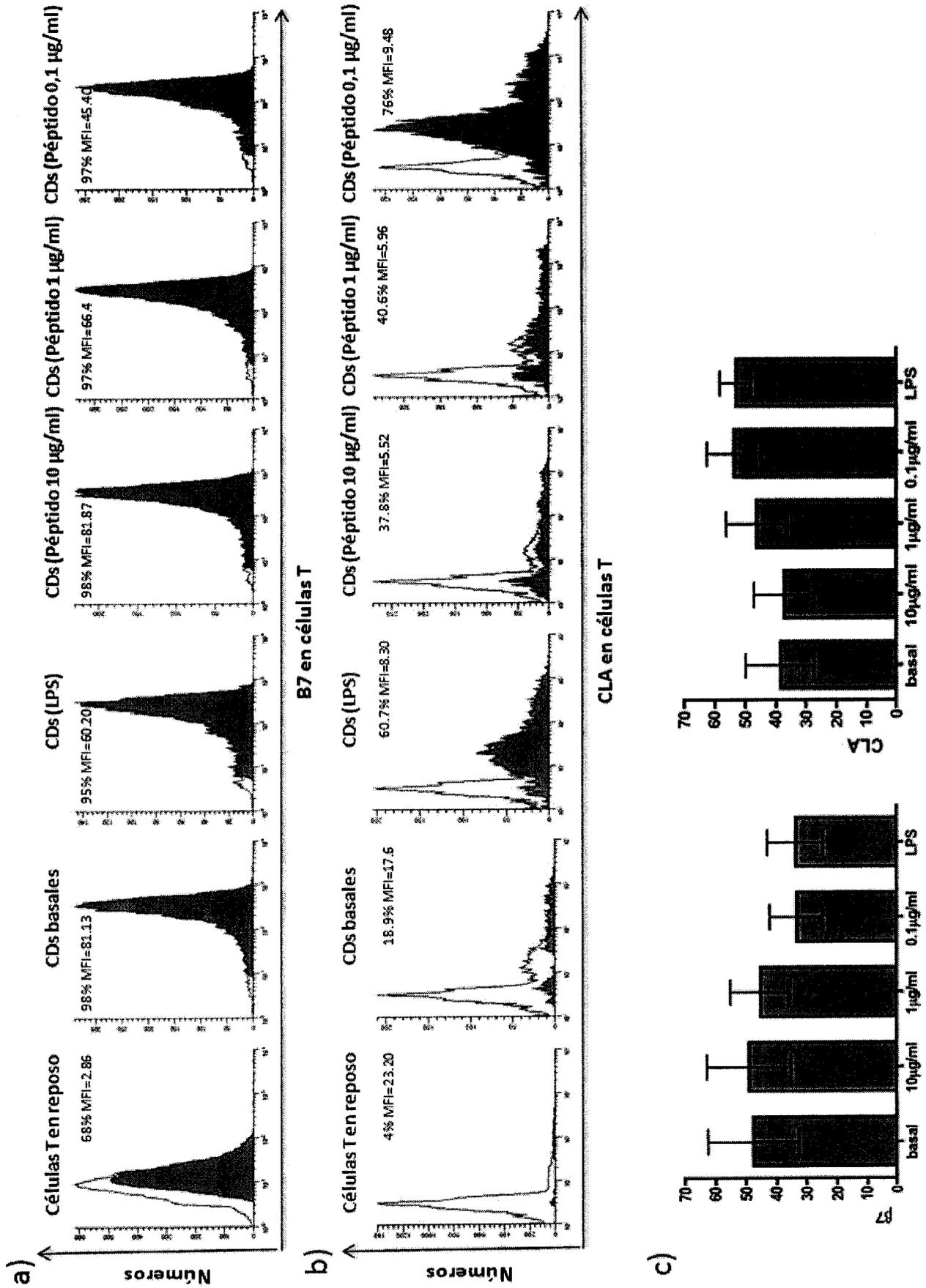


FIG. 10

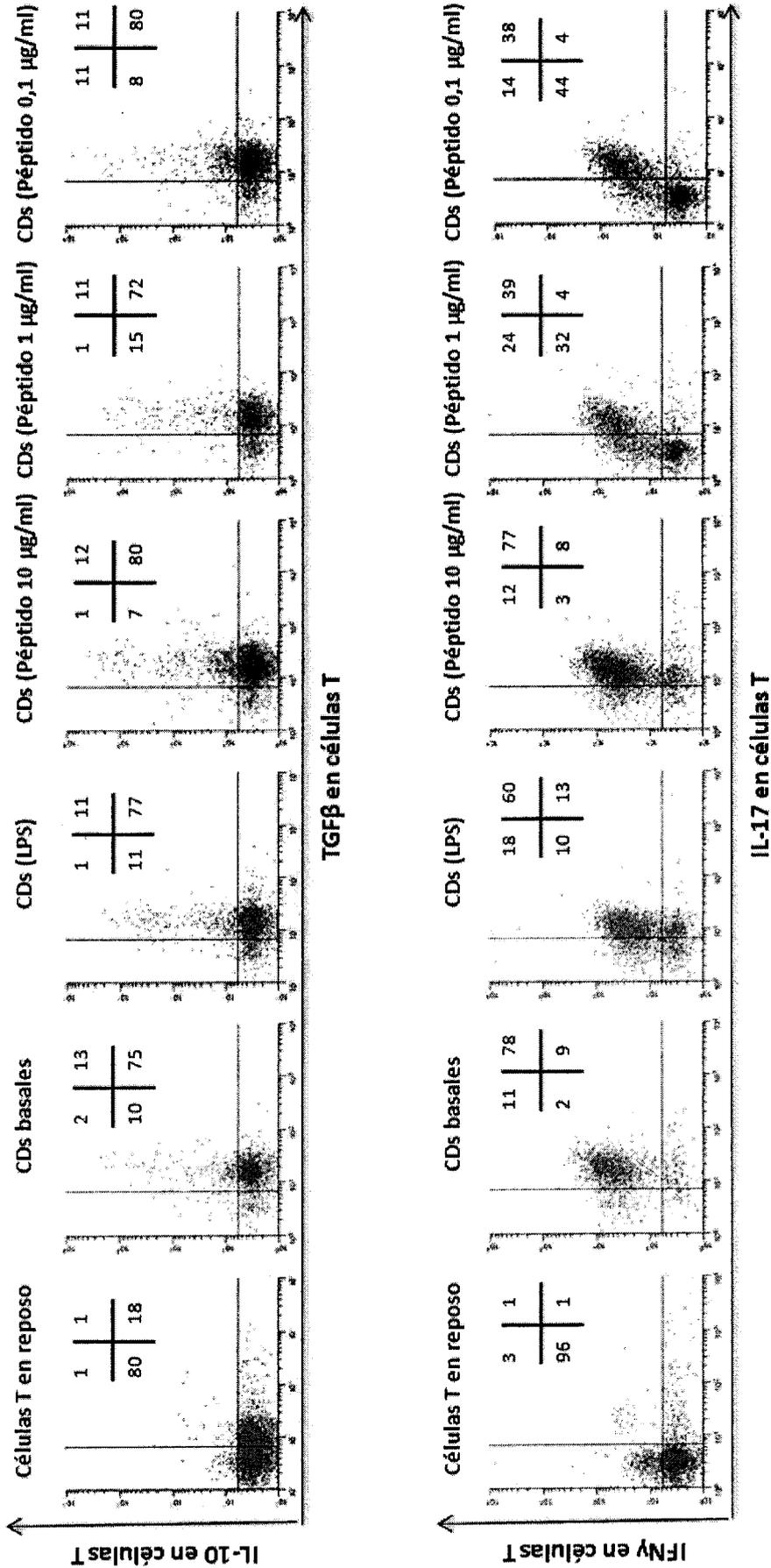


FIG. 11

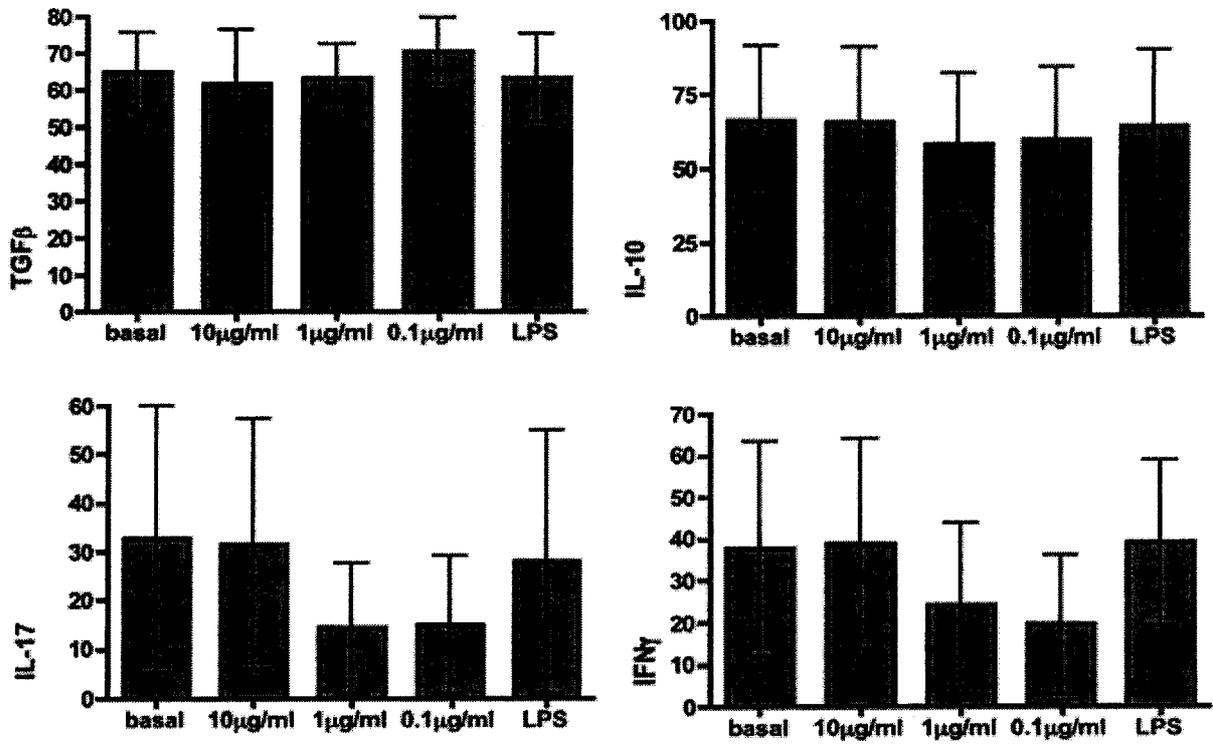
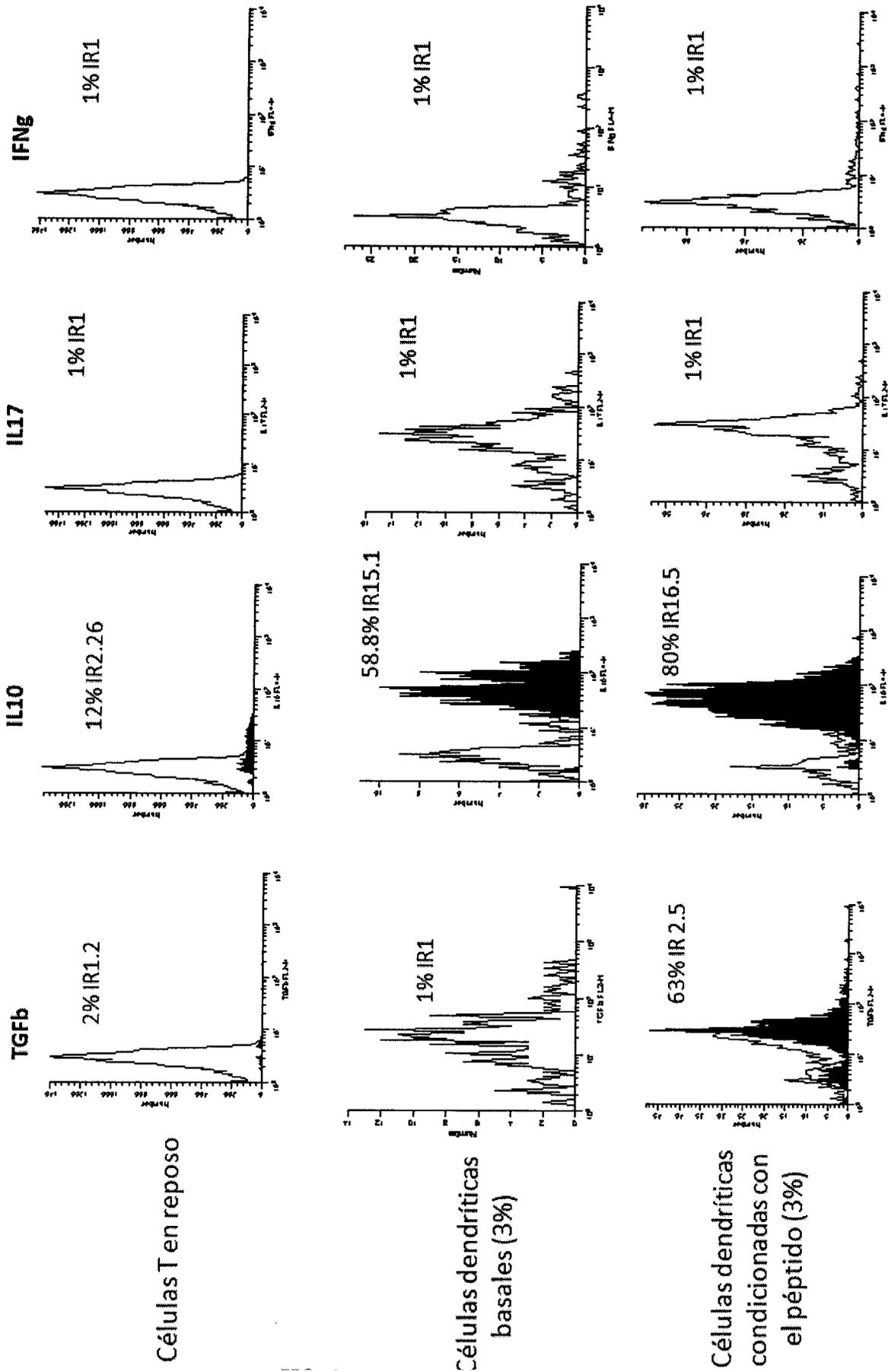


FIG. 12



10/11

FIG. 13

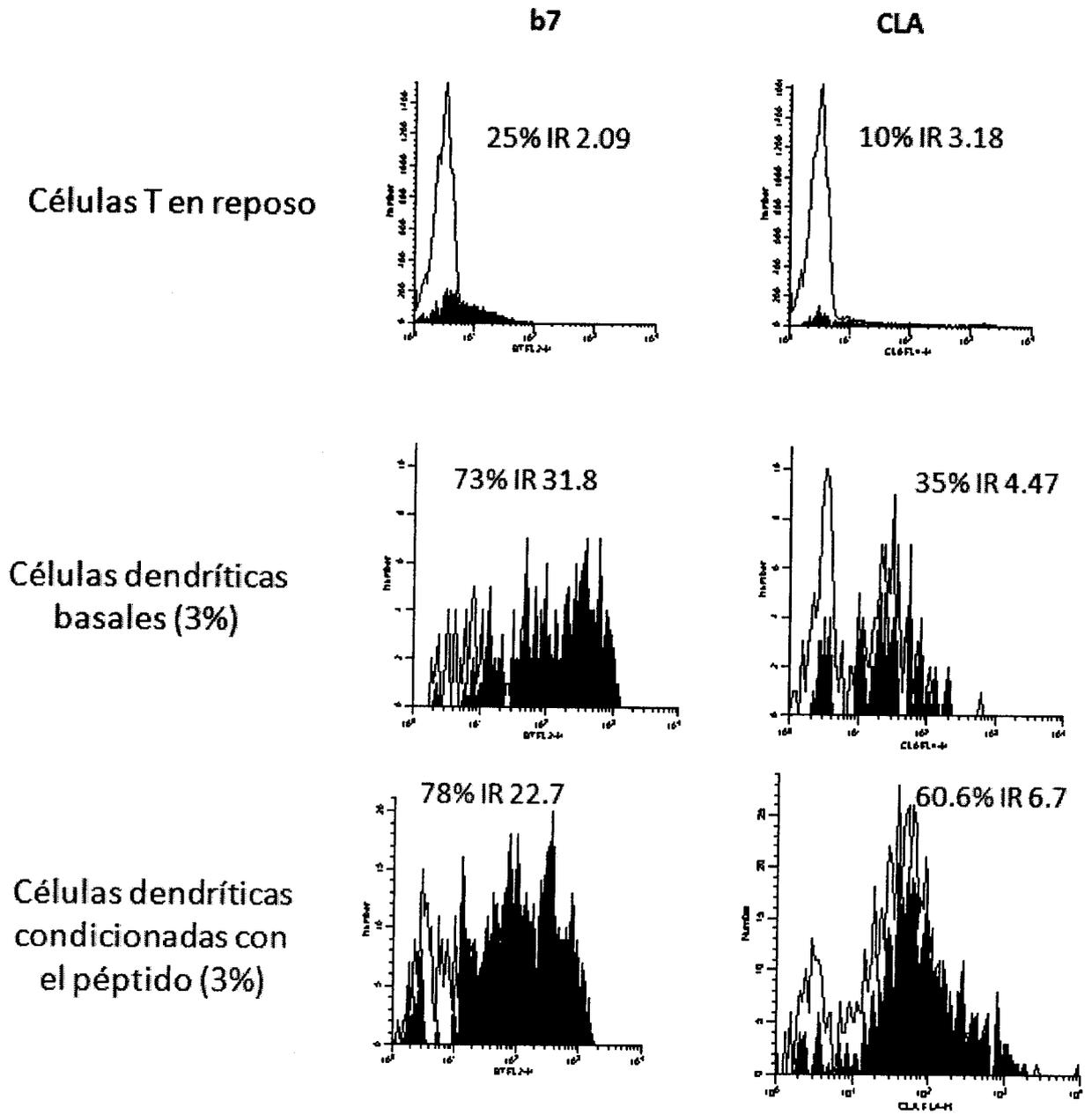
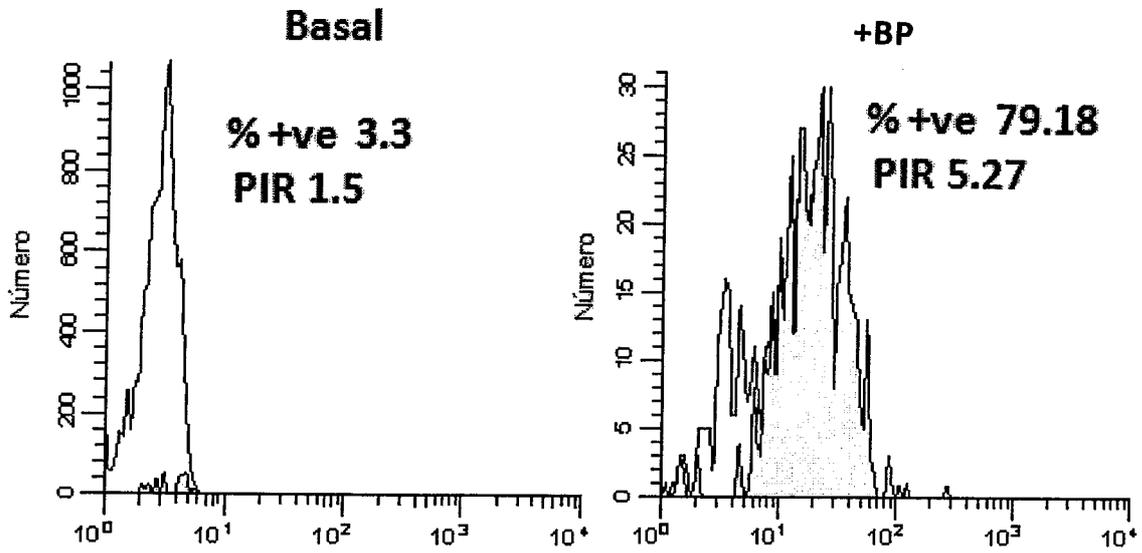
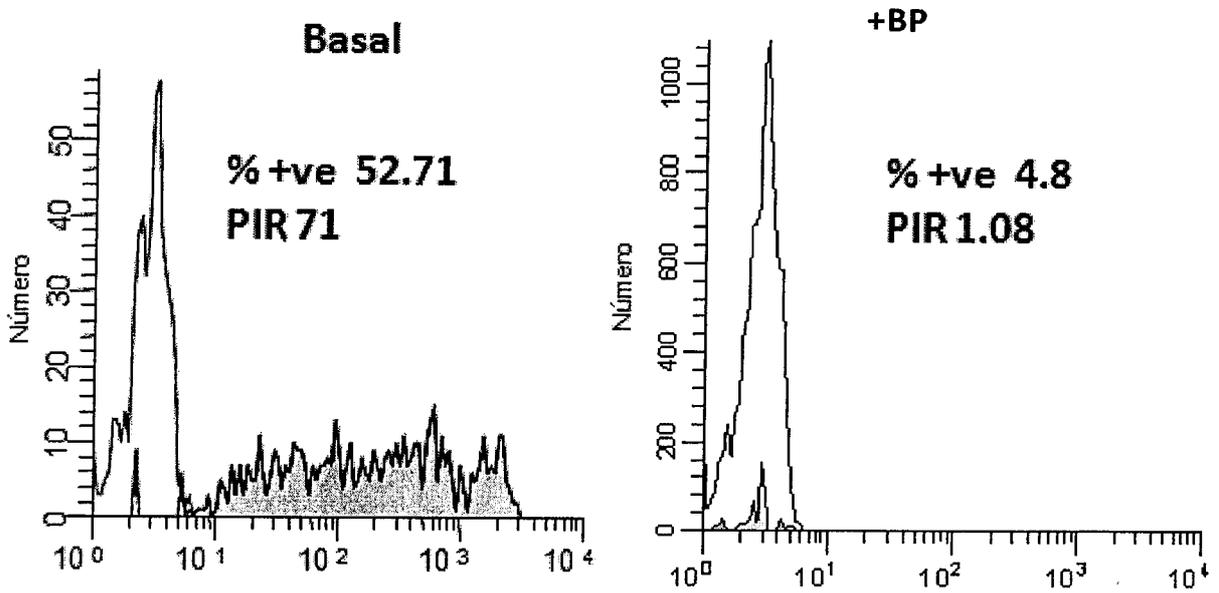


FIG. 14

IL-10



IL-12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, A61K, A23L, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011052996 A2 (CJ CHEILJEDANG CORP. [KR/KR]) 05.05.2011, paragraphs 10 -20; paragraphs 27 -35; claims 1-10.	1-14
A	WO 2009138092 A1 (OÜ TERVISLIKU PIIMA BIOTEHNOLOOGIATE ARENDUSKESKUS [EE/EE]) 19.11.2009, page 8, line 30 – page 9, line 18; page 20, line 15 – page 22, line 4; claims 1-8.	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
29/11/2012

Date of mailing of the international search report
(05/12/2012)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. García Grávalos

Telephone No. 91 3493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070643

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2848115 A1 (RHODIA CHIMIE) 11.06.2004, page 2, lines 1 – 21; page 3, line 23 – page 4, line 8; claims 1, 4, 16, 19-21.	1-14
A	WO 2006110088 A1 (BIOGAIA AB [SE/SE]) 19.10.2006, page 6, lines 14-23; claims 1-7.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2012/070643

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2011052996 A	05.05.2011	KR20110046020 A KR101178217 B CA2778372 A AU2010314024 A CN102597216 A US2012208260 A EP2494031 A EP20100827080	04.05.2011 07.09.2012 05.05.2011 10.05.2012 18.07.2012 16.08.2012 05.09.2012 27.10.2010

WO2009138092 A	19.11.2009	EE200800027 A EE05341 B KR20110018898 A EP2288360 AB EP20090745475 US2011274789 A AT536879 T DK2288360 T RU2010147343 A	15.12.2009 16.08.2010 24.02.2011 02.03.2011 12.05.2009 10.11.2011 15.12.2011 19.03.2012 20.06.2012

FR2848115 AB	11.06.2004	US2004110270 A US7179460 B WO2004052462 A AU2003298411 A AU2003298411 B AR042313 A EP1590047 AB EP20030796160 CN1795027 A CN1795027 B JP2006519759 A JP4885452B2 B JP2006519759 A US2007148148 A US7740838 B US2007148147 A AT463282 T DK1590047 T US2010322964 A US8071086 B JP2011184456 A US2012135036 A	10.06.2004 20.02.2007 24.06.2004 30.06.2004 19.02.2009 15.06.2005 02.11.2005 04.12.2003 28.06.2006 27.04.2011 31.08.2006 29.02.2012 31.08.2006 28.06.2007 22.06.2010 28.06.2007 15.04.2010 02.08.2010 23.12.2010 06.12.2011 22.09.2011 31.05.2012

WO2006110088 A	19.10.2006	AU2006234793 A AU2006234793 B US2006233775 A US7344867 B MX2007012656 A EP1868622 A EP20060733290 KR20070121700 A	19.10.2006 28.10.2010 19.10.2006 18.03.2008 13.12.2007 26.12.2007 12.04.2006 27.12.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2012/070643

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		KR101042123 B	16.06.2011
		CN101160134 A	09.04.2008
		CN101160134 B	22.08.2012
		US2008107635 A	08.05.2008
		JP2008538288 A	23.10.2008
		JP4740999B2 B	03.08.2011
		JP2008538288 A	23.10.2008
		RU2378370 C	10.01.2010
		RU2007142174 A	20.05.2009
<hr/>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070643

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/335 (2006.01)

A61K38/16 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES2012/070643

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07K, A61K, A23L, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	WO 2011052996 A2 (CJ CHEILJEDANG CORP. [KR/KR]) 05.05.2011, párrafos 10 -20; párrafos 27 -35; reivindicaciones 1-10.	1-14
A	WO 2009138092 A1 (OÜ TERVISLIKU PIIMA BIOTEHNOLOOGIATE ARENDUSKESKUS [EE/EE]) 19.11.2009, página 8, línea 30 – página 9, línea 18; página 20, línea 15 – página 22, línea 4; reivindicaciones 1-8.	1-14

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
29/11/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
05-DICIEMBRE-2012 (05/12/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Grávalos
N° de teléfono 91 3493404

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070643

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	FR 2848115 A1 (RHODIA CHIMIE) 11.06.2004, página 2, líneas 1 – 21; página 3, línea 23 – página 4, línea 8; reivindicaciones 1, 4, 16, 19-21.	1-14
A	WO 2006110088 A1 (BIOGAIA AB [SE/SE]) 19.10.2006, página 6, líneas 14-23; reivindicaciones 1-7.	1-14

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070643

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2011052996 A	05.05.2011	KR20110046020 A	04.05.2011
		KR101178217 B	07.09.2012
		CA2778372 A	05.05.2011
		AU2010314024 A	10.05.2012
		CN102597216 A	18.07.2012
		US2012208260 A	16.08.2012
		EP2494031 A	05.09.2012
		EP20100827080	27.10.2010
WO2009138092 A	19.11.2009	EE200800027 A	15.12.2009
		EE05341 B	16.08.2010
		KR20110018898 A	24.02.2011
		EP2288360 AB	02.03.2011
		EP20090745475	12.05.2009
		US2011274789 A	10.11.2011
		AT536879 T	15.12.2011
		DK2288360 T	19.03.2012
		RU2010147343 A	20.06.2012
		FR2848115 AB	11.06.2004
US7179460 B	20.02.2007		
WO2004052462 A	24.06.2004		
AU2003298411 A	30.06.2004		
AU2003298411 B	19.02.2009		
AR042313 A	15.06.2005		
EP1590047 AB	02.11.2005		
EP20030796160	04.12.2003		
CN1795027 A	28.06.2006		
CN1795027 B	27.04.2011		
JP2006519759 A	31.08.2006		
JP4885452B2 B	29.02.2012		
JP2006519759 A	31.08.2006		
US2007148148 A	28.06.2007		
US7740838 B	22.06.2010		
US2007148147 A	28.06.2007		
AT463282 T	15.04.2010		
DK1590047 T	02.08.2010		
US2010322964 A	23.12.2010		
US8071086 B	06.12.2011		
JP2011184456 A	22.09.2011		
US2012135036 A	31.05.2012		
WO2006110088 A	19.10.2006	AU2006234793 A	19.10.2006
		AU2006234793 B	28.10.2010
		US2006233775 A	19.10.2006
		US7344867 B	18.03.2008
		MX2007012656 A	13.12.2007
		EP1868622 A	26.12.2007
		EP20060733290	12.04.2006
		KR20070121700 A	27.12.2007

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070643

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		KR101042123 B	16.06.2011
		CN101160134 A	09.04.2008
		CN101160134 B	22.08.2012
		US2008107635 A	08.05.2008
		JP2008538288 A	23.10.2008
		JP4740999B2 B	03.08.2011
		JP2008538288 A	23.10.2008
		RU2378370 C	10.01.2010
		RU2007142174 A	20.05.2009
		-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07K14/335 (2006.01)

A61K38/16 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)