

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 795**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/36** (2006.01)

**C07K 14/75** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2016** **PCT/EP2016/056179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016** **WO16150926**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2016** **E 16713796 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021** **EP 3270950**

54 Título: **Péptidos aislados y fragmentos de los mismos a partir de fibrinógeno para la utilización como fármacos, particularmente en enfermedades inflamatorias de la piel**

30 Prioridad:

**20.03.2015 EP 15305414**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.11.2021**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE PARIS (14.2%)**  
**85 boulevard Saint-Germain**  
**75006 Paris, FR;**  
**ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS**  
**(14.2%);**  
**UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY (14.2%);**  
**SORBONNE UNIVERSITÉ (14.2%);**  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA**  
**RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (14.2%);**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (CNRS) (14.2%) y**  
**INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY (14.2%)**

72 Inventor/es:

**DUPIN, NICOLAS;**  
**GRANGE, PHILIPPE;**  
**CALVEZ, VINCENT y**  
**RAINGEAUD, JOËL**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 880 795 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

Péptidos aislados y fragmentos de los mismos a partir de fibrinógeno para la utilización como fármacos, particularmente en enfermedades inflamatorias de la piel

### Campo técnico de la invención

La presente invención se encuentra en el campo médico, particularmente en el campo de las enfermedades inflamatorias de la piel y más particularmente, la presente invención se refiere a péptidos aislados obtenidos a partir de fibrinógeno humano para su utilización como fármaco para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel, más particularmente acné. La presente invención asimismo se refiere a fragmentos de estos polipéptidos, a moléculas de ácido nucleico que codifican los mismos, a vectores de expresión, a células hospedadoras, a una composición farmacéutica y a un producto de combinación que contiene los mismos, y a su utilización para tratar y/o prevenir enfermedades inflamatorias de la piel, particularmente acné.

### Antecedentes de la invención

Los trastornos inflamatorios de la piel cubren una categoría amplia que incluye muchas afecciones que varían en gravedad, desde picazón leve hasta complicaciones médicas graves. Estos trastornos son habituales en personas de todas las edades y razas. Se caracterizan por irritación e inflamación de la piel. En ocasiones, estas enfermedades pueden ser desfigurantes y provocar grandes molestias al individuo afectado. Un ejemplo bien conocido de trastorno inflamatorio de la piel es el acné.

El acné es una enfermedad multifactorial de la piel que afecta a más del 80% de los adultos jóvenes. Esta enfermedad se localiza en el folículo pilosebáceo y se caracteriza por tanto lesiones inflamatorias como no inflamatorias. Los pacientes pueden presentar una mezcla de comedones no inflamatorios y pápulas, pústulas y nódulos inflamatorios. Uno de los factores que fomenta el desarrollo del acné inflamatorio es la colonización bacteriana del conducto pilosebáceo por la cepa anaerobia *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*).

En efecto, *P. acnes* es capaz de inducir la producción *in vitro* de moléculas proinflamatorias (interleucinas IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -defensinas) por queratinocitos, sebocitos y monocitos, pero asimismo *in vivo* en lesiones de acné. Esta producción implica el receptor TLR2 y la activación de las rutas de señalización de NF- $\kappa$ B y MAPK, así como la ruta del inflammasoma NLRP3. *P. acnes* asimismo induce una producción masiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) por parte de los queratinocitos, lo que contribuye al inicio de la reacción inflamatoria (Graham 2004; Grange 2009a; Grange 2009b; Kang 2005; Nagy 2005; Trivedi 2006; Qin 2014; Kistowska 2014, Jugeau 2005).

Actualmente, existen varios tratamientos antiacné tales como retinoides (derivados de vitamina A), ácido azelaico, ácido salicílico, peróxido de benzoílo, antibióticos tópicos y orales, etc.

Estos tratamientos actúan de manera diferente y presentan diferentes efectos. Generalmente, los antibióticos destruyen a las bacterias, los retinoides y el ácido azelaico previenen el desarrollo de microcomedones y presentan propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias, etc.

Otros compuestos químicos se dirigen a mecanismos específicos relacionados con la invasión bacteriana.

La *P. acnes* puede adherirse a la piel humana (Grice 2009) pero asimismo puede provocar infecciones más profundas al desplazarse desde su área sembrada hasta el sitio de infección por interacciones inespecíficas y luego un proceso de adhesión irreversible a través de una unión específica (Gristina 1988). Además, un estudio previo ha demostrado la capacidad de *P. acnes* para unirse a proteínas de la matriz extracelular (ECM) como fibronectina (Yu 1997), así como a células epiteliales humanas (Romero-Steiner 1990).

Entre los fármacos químicos que presentan un agente antiadhesión, se conoce bien Papulex®.

Sin embargo, los tratamientos mencionados anteriormente presentan muchos efectos secundarios. Por ejemplo, los ciclos de antibióticos deben ser limitados en el tiempo y, a menudo, se observa desensibilización o pérdida de respuesta. Además, la utilización de compuestos químicos induce varios riesgos para los pacientes, tales como hipopigmentación en pacientes de piel más oscura u otros efectos secundarios debidos a intolerancia al tratamiento. Otro inconveniente de la utilización de compuestos químicos para tratar el acné es su alto coste (Dawson et, 2013).

Por estos motivos, deben desarrollarse otros medios, preferentemente medios biológicos para tratar y prevenir el acné que permitan una buena eficacia del tratamiento sin efectos secundarios y un bajo coste de producción.

### Sumario de la invención

En el contexto de la presente invención, los inventores han identificado una proteína de superficie de *P. acnes* de

58 kDa reconocida específicamente por fibrinógeno humano y se denominó Pfg. Más particularmente, los inventores han descubierto que una subunidad de fibrinógeno humano es capaz de unirse específicamente a la proteína de adhesión Pfg y así inhibir su adhesión a *P. acnes*.

5 Este hallazgo no se esperaba puesto que, como es conocido por los inventores, es la primera vez que se caracterizó una glicoproteína de superficie de *P. acnes* con la capacidad de reconocer el fibrinógeno humano.

10 Este hallazgo es muy importante porque permite desarrollar medios alternativos para tratar el acné al inhibir la adhesión bacteriana a células de la piel y así prevenir y/o tratar la infección e inflamación de la piel inducida por la adhesión bacteriana. Además, los inventores descubrieron que dicha subunidad de fibrinógeno presenta propiedades antiinflamatorias más generales y, por tanto, puede utilizarse de manera más general para prevenir y/o tratar otros trastornos inflamatorios de la piel, preferentemente psoriasis.

15 En un primer aspecto, la presente invención se refiere por tanto a un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos el 80% con la SEC ID N°: 1 después de una alineación global óptima, o su fragmento que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos el 80% con cualquiera de las SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 después de una alineación global óptima, para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel.

20 La SEC ID N°: 1 corresponde a la subunidad B $\beta$  humana de fibrinógeno, mientras que las SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 corresponden a fragmentos de esta secuencia.

25 El polipéptido según la invención es capaz de reconocer y unirse a *P. acnes*, y asimismo inhibir la adhesión de *P. acnes* a su ligando fibrinógeno y a células de la piel.

Por tanto, el polipéptido para la utilización terapéutica según la presente invención puede utilizarse preferentemente para prevenir y/o tratar el acné.

30 Los inventores asimismo han descubierto que el polipéptido aislado para la utilización terapéutica según la invención puede utilizarse para el tratamiento y/o la prevención de otras enfermedades inflamatorias de la piel, preferentemente psoriasis.

35 Los inventores asimismo han aislado fragmentos de la subunidad B $\beta$  de fibrinógeno humano que reconocen y se unen a la proteína de adhesión de *P. acnes*, e inhiben la adhesión de *P. acnes* a su ligando fibrinógeno y a células de la piel.

40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un fragmento de 5 a 20 aminoácidos, de SEC ID N°: 1, comprendiendo dicho fragmento una secuencia de aminoácidos seleccionada de una de las SEC ID N°: 7 a 12, o un fragmento seleccionado de las SEC ID N°: 2, 5 a 13 y 47.

45 En un tercer aspecto, la invención asimismo se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica los fragmentos de la invención, a un vector que comprende el ácido nucleico de la invención y a una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico según la invención o el vector según la invención. a la invención.

50 Los fragmentos de la invención son capaces de reconocer y unirse a *P. acnes*, y asimismo inhibir la adhesión de *P. acnes* a su ligando fibrinógeno y a células de la piel. Por lo tanto, estos fragmentos pueden presentar un gran potencial como agente antiadhesión en fármacos para prevenir y/o tratar enfermedades inflamatorias, particularmente el acné.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere así a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto seleccionado del fragmento, la molécula de ácido nucleico aislada, el vector o la célula hospedadora según la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La presente invención asimismo se refiere a la molécula de ácido nucleico aislada, el vector, la célula hospedadora o la composición farmacéutica según la invención, para su utilización como medicamento.

60 Preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada, el vector, la célula hospedadora o la composición farmacéutica según la invención se utilizan para el tratamiento y/o la prevención de acné.

Los inventores asimismo han descubierto que la molécula de ácido nucleico aislada, el vector, la célula hospedadora o la composición farmacéutica según la invención pueden utilizarse para el tratamiento y/o la prevención de otras enfermedades inflamatorias de la piel, preferentemente psoriasis.

65 El fragmento, la molécula de ácido nucleico aislada, el vector, la célula hospedadora o la composición farmacéutica de la presente invención pueden utilizarse solos o en combinación con otro agente terapéutico que esté implicado

en la prevención y/o el tratamiento del acné y/o la prevención del acné y/o la prevención y/o el tratamiento de otras enfermedades inflamatorias, preferentemente psoriasis.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un producto de combinación, que comprende:

- por lo menos un compuesto seleccionado del fragmento, la molécula de ácido nucleico aislada, el vector y la célula hospedadora según la invención; y
- otro agente farmacéutico, preferentemente utilizado para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel seleccionadas de psoriasis y/o acné, preferentemente acné;

para la utilización simultánea, independiente o secuencial como medicamento.

El objetivo del producto de combinación según la invención es potenciar el efecto terapéutico del fragmento según la invención.

### Descripción de las figuras

Figura 1: identificación de una proteína de superficie de *P. acnes* de 58 KDa reconocida por fibrinógeno. Se cultivó la cepa de *P. acnes* 6919 a 37°C en condiciones anaerobias en RCM, RCM complementado con Tween-80 al 0.1% y Columbia complementado con el 5% de sangre de oveja. (A) Se extrajeron térmicamente las proteínas de superficie de *P. acnes* (75 µg) a 60°C en PBS (carril 2) y a 45°C en LiCl 1 M (carril 3), y se separaron sobre SDS-PAGE al 12,5%, se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con fibrinógeno biotinilado, colágenos I, IV, VI y VIII (0.1 µg/ml) durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron experimentos de control utilizando HRP-estreptavidina sola. Carriles 1: Patrones de peso molecular.

Figura 2 : unión de la proteína de superficie de *P. acnes* a fibrinógeno humano purificado. (A) Se inmovilizaron proteínas de superficie de *P. acnes* (de 0.8 a 50 µg/ml) sobre una placa de poliestireno de 96 pocillos y se analizaron con sonda con fibrinógeno biotinilado (0.1 µg/ml) durante 2 h a temperatura ambiente. (B) Se inmovilizaron las proteínas de superficie de *P. acnes* (25 µg/ml) sobre una placa de poliestireno de 96 pocillos y se analizaron con sonda con diversas concentraciones de fibrinógeno biotinilado que oscilaron entre 0.1 y 16 µg/ml durante 2 h a temperatura ambiente. Se detectó el fibrinógeno biotinilado unido con HRP-estreptavidina tal como se describe en Materiales y métodos.

Figura 3: identificación de Pfg. Se separaron cPAHE (200 µg) mediante electroforesis 2D. (A) Se detectaron proteínas mediante tinción con plata. (B) Se determinó la actividad de unión a fibrinógeno con fibrinógeno biotinilado utilizando el ensayo de inmunotransferencia de ligando de tipo Western tal como se describe en Material y métodos. Carril 1, patrón de peso molecular; carril 2, muestra separada sólo mediante SDS-PAGE (1DE) al 10% (50 µg de proteína); carril 3, muestra después de 2DE tal como se describe en Materiales y métodos. La flecha indica la mancha cortada para su identificación mediante MALDI-ToF. (C) Espectros de MALDI-ToF obtenidos para la mancha de interés. Se utilizaron masas de péptidos monoisotópicos para buscar en las bases de datos de proteínas para hacer coincidir y posteriormente identificar la mancha de proteína.

Figura 4: purificación de Pfg. Se extrajeron proteínas de superficie de *P. acnes* con LiCl al 1% a 42°C durante 2 h y luego se concentraron mediante precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación. (A) Se cargó cPAHE (85 mg) en una columna UNOsphere Q a 24 ml/h. Se eluyeron las equilibraron equilibradas en Tris 25 mM, pH 8,0 con gradientes lineales de 0 a 160 mM durante 60 min y NaCl de 160 a 200 mM, Tris 25 mM, pH 8,0 durante 90 min (●). Se desalaron las fracciones combinadas que contenían Pfg y se equilibraron en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.1 M, pH 8,0. (B) Se fraccionaron las proteínas mediante cromatografía de filtración en gel en una columna Sephacryl HR S300 a 6 ml/h. Se determinó el volumen inicial (V<sub>0</sub>) con tiroglobulina (669 kDa) y se indicaron mediante flechas las posiciones de elución para globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa), mioglobina equina (17 kDa) y vit. B12 (1,3 kDa). Se monitorizó la concentración de proteína a 280 nm (●). Se determinó la actividad de unión a fibrinógeno (■) con fibrinógeno biotinilado tal como se describe en Materiales y métodos. Las líneas horizontales etiquetadas como F2, F2.2 indican las fracciones agrupadas que contienen actividad de unión a fibrinógeno. (C) Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE al 10% y se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie. (D) Después de la separación electroforética, se transfirieron las proteínas a la membrana de nitrocelulosa y se detectó la actividad de unión a fibrinógeno con fibrinógeno biotinilado. Los carriles 1a/b contienen marcadores de masa molecular no teñidos y biotinilados, respectivamente. Carril 2: extracto de proteína total con lito de superficie de *P. acnes* (10 µg). Carril 3: extracto de proteína de superficie concentrado (10 µg). Carriles 4 y 5: 10 µg de fracciones F2 y F2.2 agrupadas, respectivamente.

Figura 5: unión de proteínas de superficie de *P. acnes* a fibrinógeno. (A) Se inmovilizaron diversas cantidades de fibrinógeno humano (hFg) y fibrinógeno bovino (bFg) sobre una placa de poliestireno de 96 pocillos a 4°C durante 18 h y se incubaron con Pfg biotinilada a 0.1 µg/ml durante 2 h a 23°C. Se utilizó albúmina de suero

bovino (BSA) como control negativo. Se detectó el material unido utilizando el conjugado HRP-estreptavidina. Se midió la actividad peroxidasa utilizando el sustrato ABTS a 405 nm. Se separaron las proteínas (10 µg por carril) mediante SDS-PAGE al 10% y se detectaron mediante (B) tinción con azul de Coomassie, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con (C) HRP-estreptavidina sola y (D) Pfg biotinilada (0.1 µg/ml). Carriles 1: patrones de peso molecular. Carril 2: BSA. Carril 3: hFg. Carril 4: bFg.

Figura 6: reconocimiento de Pfg en fibrinógeno N-desglicosilado. Se sometieron fibrinógeno humano (hFg) y fibrinógeno bovino (bFg) purificados a tratamiento con N-glicosidasa F (PNGasa F) tal como se describe en Materiales y métodos. Se separaron muestras sin tratar (carriles 2 y 4) y tratadas (carriles 3 y 5) (10 µg de proteína por carril) en SDS-PAGE al 10% y luego se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa. (A) Se detectaron proteínas mediante tinción con azul de Coomassie. (B) Actividad de unión con Pfg biotinilada (0.1 µg/ml). (C) Se utilizó la actividad de unión a lectina RCA-I biotinilada como control de desglicosilación. Carriles 1: patrones de peso molecular.

Figura 7: reconocimiento de Pfg en fibrinógeno O-desglicosilado. Se sometió fibrinógeno humano purificado a tratamiento con O-glicosidasa tal como se describe en Materiales y métodos. Se separaron muestras sin tratar (carril 2) y tratadas (carril 3) (10 µg de proteína por carril) en SDS-PAGE al 10% y luego se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa. (A) Se detectaron proteínas mediante tinción con azul de Coomassie. (B) Actividad de unión con Pfg biotinilada (0.1 µg/ml). (C) Se utilizó la actividad de unión a lectina de tipo jacalina biotinilada como control de desglicosilación. Los carriles 1a y 1b corresponden a los patrones de peso molecular.

Figura 8: clonación de fragmentos de fibrinógeno humano B $\beta$  y unión con Pfg. (A) Clonación y expresión de fragmentos de fibrinógeno B $\beta$  humano recombinante Fg1, Fg2, Fg3 y Fg4. Se obtuvieron fragmentos de fibrinógeno mediante RT-PCR y se construyeron plásmidos de expresión tal como se describe en Materiales y métodos. (B) Se expresaron proteínas fusionadas con GST en *E. coli*, se fraccionaron mediante SDS-PAGE al 12,5%, y se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie (B), y se incubaron con Pfg biotinilada (0.1 µg/ml) tal como se describe en Materiales y métodos (C).

Figura 9: inhibición dependiente de la dosis de la unión de Pfg biotinilada a fibrinógeno por el péptido derivado de fibrinógeno. Se pretrató Pfg biotinilada (0.4 mg) con una cantidad creciente de péptidos recombinantes Fg1 (♦), Fg2 (■) o BSA como control (●) durante 1 hora a 37°C, y se evaluó la actividad de unión a fibrinógeno recubierto sobre una placa de poliestireno (25 µg por pocillo). Se expresan los resultados como la media  $\pm$  D.E. Cada punto se realizó por cuadruplicado.

Figura 10: evaluación de la viabilidad celular después del tratamiento con los péptidos recombinantes Fg1 y Fg2. Se incubaron líneas celulares de queratinocitos inmortalizados y primarios humanos HaCaT y NHDK; la línea celular de monocitos inmortalizados ThP1 y líneas celulares de fibroblastos inmortalizados y primarios MRC5 y HDF con los péptidos recombinantes Fg1 y Fg2 con concentraciones que oscilaron entre 0.22 y 7 mM durante 18 h a 37°C. Se evaluó la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT tal como se describe en Materiales y métodos.

Figura 11: dependencia de la dosis de la actividad de unión de la cepa de *P. acnes* RON en varias líneas celulares. Se incubó la cepa de *P. acnes* RON biotinilada a concentraciones ajustadas a 0.01, 0.1 y 0.5 de absorbancia a 600 nm durante 1 h a 37°C con las líneas celulares de queratinocitos inmortalizados y primarios humanos HaCaT y NHDK; con la línea celular de monocitos inmortalizados ThP1, y con las líneas celulares de fibroblastos inmortalizados y primarios MRC5 y HDF. Después de retirar las bacterias no unidas, se detectó la actividad de adhesión a 410 nm. Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001) y \*\*\*\* (P < 0.0001), respectivamente.

Figura 12: inhibición dependiente de la dosis de la unión *P. acnes* a queratinocitos. Se pretrató la cepa de *P. acnes* 6919 biotinilada a concentraciones ajustadas a 0.1 de absorbancia a 600 nm con fibrinógeno completo humano (barra de color gris oscuro) y bovino (barra de color gris claro) en concentraciones que oscilaron entre 0.01 y 0.5 mM y se incubó durante 1 h a 37°C con la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. Después de retirar las bacterias no unidas, se detectó la actividad de adhesión a 410 nm. Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001) y \*\*\*\* (P < 0.0001), respectivamente.

Figura 13: inhibición dependiente de la dosis de la unión de *P. acnes* RON a la línea celular de monocitos. Se pretrató la cepa de *P. acnes* RON biotinilada a concentraciones ajustadas a 0.1 de absorbancia a 600 nm con los péptidos recombinantes Fg1 y Fg2 y se incubó durante 1 h a 37°C con la línea celular de monocitos inmortalizados humanos ThP1. Después de retirar las bacterias no unidas, se detectó la actividad de adhesión a 410 nm. Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001) y \*\*\*\* (P < 0.0001), respectivamente.

Figura 14: inhibición dependiente de la dosis de la producción  $O_2^{\bullet-}$  por queratinocitos estimulada por *P. acnes* pretratada con péptido recombinante. Se incubaron células HaCaT durante 18 h con la cepa de *P. acnes* PIE a una concentración ajustada a 0.2 de absorbancia a 600 nm (barra de color azul) y con *P. acnes* pretratada con el péptido recombinante Fg1 (barra de color gris claro) y Fg2 (barra de color gris oscuro). Se realizó la medición de la producción de anión superóxido mediante espectrofluorometría tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizó un experimento de control en células HaCaT no estimuladas (barra de color rojo). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001) y \*\*\*\* (P < 0.0001), respectivamente.

Figura 15: inhibición dependiente de la dosis de la producción de IL-8 por fibroblasto estimulado por *P. acnes* pretratada con péptido recombinante. Se incubaron células MRC5 durante 18 h con la cepa de *P. acnes* RON a una concentración ajustada a 0.2 de absorbancia a 600 nm (barra de color azul) y con *P. acnes* pretratada con el péptido recombinante Fg1 (barra de color gris claro) y Fg2 (barra de color gris oscuro). Se midió la concentración de IL-8 mediante ELISA tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizó un experimento de control en células HaCaT no estimuladas (barra de color rojo). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001) y \*\*\*\* (P < 0.0001), respectivamente.

Figura 16: evaluación de la viabilidad celular después del tratamiento con los péptidos pequeños generados a partir de Fg1 en queratinocitos. Se incubaron células HaCaT durante 24 h con los péptidos pequeños Fg1.1 (barra de color gris claro), Fg1.2 (barra con líneas horizontales), Fg1.3 (barra sombreada), Fg1.4 (barra de color gris oscuro), Fg1.5 (barra punteada) a concentraciones que oscilaron entre 2,5 y 20  $\mu$ M. Se determinó la medición de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células HaCaT incubadas con PBS (correspondiente a células viables); y con Triton X100 al 0.2% (correspondiente a células muertas). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes.

Figura 17: inhibición dependiente de la dosis de la producción de  $H_2O_2$  por fibroblastos pretratados con péptidos pequeños generados a partir de Fg1 y estimulados por *P. acnes*. Se incubaron células MRC5 durante 24 h con péptidos pequeños Fg1.1 (barra de color gris claro), Fg1.2 (barra con líneas horizontales), Fg1.3 (barra sombreada), Fg1.4 (barra de color gris oscuro), Fg1.5 (barra punteada) a concentraciones que oscilaron entre 2,5 y 20  $\mu$ M. Se realizó la medición de la producción de peróxido de hidrógeno mediante espectrofluorometría tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células MRC5 no estimuladas (barra de color blanco) y MRC5 estimuladas con *P. acnes* (barra de color negro). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001) y \*\*\*\* (P < 0.0001), respectivamente.

Figura 18: inhibición dependiente de la dosis de la producción de  $H_2O_2$  por queratinocitos pretratados con péptidos pequeños generados a partir de Fg1 y estimulados por ácido lipoteicoico (LTA). Se incubaron células NHDK durante 24 h con el péptido recombinante Fg1 (barra de color gris claro) y Fg2 (barra de color gris oscuro) a concentraciones que oscilaron entre 1,75 y 7  $\mu$ M. Se realizó la medición de la producción de peróxido de hidrógeno mediante espectrofluorometría tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células NHDK no estimuladas (barra de color blanco) y HDF estimuladas con LTA a 10  $\mu$ g/ml (barra de color negro). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001) y \*\*\*\* (P < 0.0001), respectivamente.

Figura 19: inhibición dependiente de la dosis de la producción de IL-8 por queratinocitos pretratados con péptidos pequeños generados a partir de Fg1 y estimulados por peptidoglicano (PGN). Se incubaron células NHDK durante 24 h con el péptido recombinante Fg1 (barra de color gris claro) y Fg2 (barra de color gris oscuro) a concentraciones que oscilaron entre 1,75 y 7  $\mu$ M. Se realizó la medición de la producción de IL-8 mediante ELISA tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células NHDK no estimuladas (barra de color blanco) y HDF estimuladas con PGN a 10  $\mu$ g/ml (barra de color negro). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001) y \*\*\*\* (P < 0.0001), respectivamente.

Figura 20: evaluación de la viabilidad celular después del tratamiento con los péptidos pequeños generados a partir de Fg1.1 en queratinocitos. Se incubaron células HaCaT durante 24 h con péptidos pequeños Fg1.1.1 (barra de color gris claro), Fg1.1.2 (barra con líneas horizontales), Fg1.1.3 (barra sombreada), Fg1.1.4 (barra de color gris oscuro), Fg1.1.6 (barra punteada) a concentraciones que oscilaron entre 2,5 y 20  $\mu$ M. Se determinó la medición de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células HaCaT incubadas con PBS (correspondiente a células viables); y con Triton X100 al 0.2% (correspondiente a células muertas). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes.

Figura 21: evaluación de la viabilidad celular después del tratamiento con el vehículo utilizado para preparar la disolución de péptidos generados a partir de Fg1.1 en queratinocitos. Se incubaron células HaCaT durante 24 h con disoluciones diluidas de vehículo correspondientes a las condiciones utilizadas con Fg1.1.1 (barra de color gris claro), Fg1.1.2 (barra con líneas horizontales), Fg1.1.3 (barra sombreada), Fg1.1.4 (barra de color gris oscuro), Fg1.1.6 (barra de puntos). Se determinó la medición de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células HaCaT incubadas con PBS (correspondiente a células viables); y con Triton X100 al 0.2% (correspondiente a células muertas). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes.

Figura 22: inhibición dependiente de la dosis de la producción de IL-8 por queratinocitos estimulados por *P. acnes* pretratada con péptidos pequeños generados a partir de Fg1.1. Se incubaron células HaCaT durante 24 h con los péptidos pequeños Fg1.1.1 (barra de color gris claro), Fg1.1.2 (barra con líneas horizontales), Fg1.1.3 (barra sombreada), Fg1.1.4 (barra de color gris oscuro), Fg1.1.6 (barra punteada) a concentraciones que oscilaron entre 2,5 y 20  $\mu$ M. Se realizó la medición de la producción de IL-8 mediante ELISA tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células HaCaT no estimuladas (barra de color blanco) y HaCaT estimuladas con *P. acnes* (barra de color negro). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ) y \*\*\*\* ( $P < 0.0001$ ), respectivamente.

Figura 23: inhibición dependiente de la dosis de la producción de IL-8 por fibroblastos pretratados con péptidos pequeños generados a partir de Fg1.1 y estimulados por *P. acnes*. Se incubaron células MCR5 durante 24 h con los péptidos pequeños Fg1.1.1 (barra de color gris claro), Fg1.1.2 (barra con líneas horizontales), Fg1.1.3 (barra sombreada), Fg1.1.4 (barra de color gris oscuro), Fg1.1.6 (barra punteada) a concentraciones que oscilaron entre 2,5 y 20  $\mu$ M. Se realizó la medición de la producción de IL-8 mediante ELISA tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células MCR5 no estimuladas (barra de color blanco) y MCR5 estimuladas con *P. acnes* (barra de color negro). Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes. La significación estadística se indica mediante \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ) y \*\*\*\* ( $P < 0.0001$ ), respectivamente.

Figura 24: efecto del gel de péptido Fg1.1.1 al 5% sobre la inflamación inducida por *P. acnes in vivo*. Se inyectó a los ratones en la oreja por vía intradérmica *P. acnes* ( $DO_{620\text{ nm}} = 1.0$  correspondiente a  $2 \cdot 10^7$  UFC/20  $\mu$ l en PBS) para inducir inflamación. Posteriormente, se aplicó gel de péptido Fg1.1.1 al 5% en la superficie de la piel de la oreja de los ratones cada día durante 3 días (flechas). Se midió la puntuación correspondiente al grosor de la oreja, la descamación y el enrojecimiento, cada día durante un periodo de 96 h. Los datos son medias  $\pm$  D.E. de ocho experimentos individuales. PBS corresponde al grupo no tratado al que se le inyectó PBS. PA + péptido TOPIC corresponde a *P. acnes* inyectada en orejas tratadas con vaselina sola. PA + péptido TOPIC corresponde a *P. acnes* inyectada en orejas tratadas con el péptido Fg1.1.1 al 5% mezclado con vaselina. La significación estadística se indica mediante \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ) y \*\*\*\* ( $P < 0.0001$ ), respectivamente.

Figura 25: efecto del péptido Fg1.1.1 sobre la inflamación inducida por *P. acnes in vivo*, en el que se pretrató *P. acnes* con Fg1.1.1. Se pretrató la cepa de *P. acnes* ( $DO_{620\text{ nm}} = 1,5$ ) durante 1 h a 37°C con el péptido Fg1.1.1 (140  $\mu$ M) (PA + péptido inyectado) o con el vehículo (1% de DMSO final en PBS) (PA + vehículo inyectado) y luego se inyectó por vía intradérmica en orejas de ratones (aproximadamente  $2 \cdot 10^7$  UFC/20  $\mu$ l) para inducir inflamación. Al grupo de control se le inyectó PBS sola. Se midió la puntuación correspondiente al grosor de la oreja, la descamación y el enrojecimiento, cada día durante un periodo de 96 h. Los datos son medias  $\pm$  D.E. de ocho experimentos individuales. La significación estadística se indica mediante \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ) y \*\*\*\* ( $P < 0.0001$ ), respectivamente.

Figura 26: efectos de la inyección intradérmica y la aplicación tópica del péptido Fg1.1.1 sobre la inflamación inducida por *P. acnes* en ratones. (1) Oreja en que se inyectó sólo PBS. (2) Después de 96 h de exposición a *P. acnes* ( $2 \cdot 10^7$  UFC/20  $\mu$ l en PBS). (3) Después de 96 h de *P. acnes* mezclado con el 1% de DMSO final. (4) Después de 96 h de exposición a *P. acnes* con la aplicación tópica de vaselina. (5) Después de 96 h de *P. acnes* mezclado con el péptido Fg1.1.1. (6) Después de 96 h de exposición a *P. acnes* con la aplicación tópica del péptido Fg1.1.1.

Figura 27: análisis histopatológico de orejas de ratón. (1) Oreja en que se inyectó sólo PBS. (2) Después de 96 h de exposición a *P. acnes* ( $2 \cdot 10^7$  UFC/20  $\mu$ l en PBS), tumefacción de la oreja y células inflamatorias infiltradas. (3 y 4) No se han modificado la tumefacción de la oreja y la mayoría de las células inflamatorias infiltradas con la inyección y aplicación de vehículo, respectivamente. (5 y 6) Se han reducido la tumefacción de la oreja y las células inflamatorias infiltradas mediante la inyección y la aplicación tópica del péptido Fg1.1.1, respectivamente. Los datos son representativos de ocho experimentos individuales con resultados similares.

Figura 28: efectos de la inyección intradérmica y la aplicación tópica del péptido Fg1.1.1 sobre la activación de

linfocitos inducida por *P. acnes* en ratones. (A) Se inyectó a los ratones en la oreja por vía intradérmica *P. acnes* ( $DO_{620\text{ nm}} = 1.0$  correspondiente a  $2 \cdot 10^7$  UFC/20  $\mu$ l en PBS) para inducir inflamación. Posteriormente, se aplicó gel de péptido Fg1.1.1 al 5% sobre la superficie de la piel de la oreja de los ratones cada día durante 3 días (flechas). PA + vehículo tópico corresponde a *P. acnes* inyectada en orejas tratadas con vaselina sola. PA + péptido tópico corresponde a *P. acnes* inyectada en orejas tratadas con el péptido Fg1.1.1 al 5% mezclado con vaselina. PBS corresponde al grupo no tratado al que se le inyectó PBS. (B) Se pretrató la cepa de *P. acnes* ( $DO_{620\text{ nm}} = 1,5$ ) durante 1 h a 37°C con el péptido Fg1.1.1 (140  $\mu$ M) (PA + péptido inyectado) o con el vehículo (1% de DMSO final en PBS) (PA + vehículo inyectado) y luego se inyectó por vía intradérmica en orejas de ratones (aproximadamente  $2 \cdot 10^7$  UFC/20  $\mu$ l) para inducir inflamación. Al grupo de control se le inyectó PBS sola. A las 96 h después de la infección, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los ganglios óticos para someter a prueba su capacidad para proliferar después de 72 h de crecimiento en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Se realizaron mediciones de proliferación con el reactivo Uptiblu. Los datos son medias  $\pm$  D.E. de ocho experimentos individuales. La significación estadística se indica mediante \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ) y \*\*\*\* ( $P < 0.0001$ ), respectivamente.

Figura 29: inhibición dependiente de la dosis de la producción de IL-8 por queratinocitos estimulados por *P. acnes* pretratada con Fg1 o con péptidos Fg1.1.1. Se incubaron células HaCaT durante 24 h a 37°C con *P. acnes* pretratada durante 1 h a 37°C con el péptido Fg1 (barra de color gris claro) y el péptido Fg1.1.1 (barra de color gris oscuro), a concentraciones que oscilaron entre 2,5 y 10  $\mu$ M. Se realizaron experimentos de control con células HaCaT no estimuladas (célula sola) y con células HaCaT estimuladas con *P. acnes* no pretratada (célula + PA). Se realizó la medición de la producción de IL-8 mediante ELISA tal como se describe en Materiales y métodos. Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes.

Figura 30: inhibición de la producción de IL-8 por queratinocitos estimulados por IL-17, OSM y TNF- $\alpha$ . Se estimularon células NHEK por una combinación de IL-17, OSM y TNF- $\alpha$  (3 ng/ml cada uno) y se trataron con inhibidor de JAK a 10  $\mu$ M (control positivo) o Fg1.1.1 en concentraciones que oscilaron entre 1,52 y 12,2  $\mu$ M durante 48 h. Se realizó la medición de la producción de IL-8 mediante ELISA y se determinó la citotoxicidad mediante el ensayo de MTT tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células NHEK no tratadas y no estimuladas (célula sola) y con NHEK no tratadas, estimuladas por la combinación de IL-17, OSM y TNF- $\alpha$ . Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos individuales. La significación estadística está indicada por \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) y \*\*\* ( $P < 0.001$ ), respectivamente.

Figura 31: inhibición de la producción de hBD-2 por queratinocitos estimulados por IL-17, OSM y TNF- $\alpha$ . Se estimularon células NHEK por una combinación de IL-17, OSM y TNF- $\alpha$  (5 ng/ml cada uno) y se trataron con inhibidor de JAK a 10  $\mu$ M (control positivo) o Fg1.1.1 en concentraciones que oscilaron entre 1,52 y 12,2  $\mu$ M durante 72 h. Se realizó la medición de la producción de hBD-2 mediante ELISA y se determinó la citotoxicidad mediante el ensayo de MTT tal como se describe en Materiales y métodos. Se realizaron experimentos de control con células NHEK no tratadas y no estimuladas (célula sola) y con NHEK no tratadas, estimuladas por la combinación de IL-17, OSM y TNF- $\alpha$ . Los datos son medias  $\pm$  D.E. de tres experimentos individuales. La significación estadística está indicada por \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) y \*\*\* ( $P < 0.001$ ), respectivamente.

## Descripciones detalladas

### Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

En la presente descripción el término “polipéptido” se refiere a un polímero lineal de aminoácidos conectados por enlaces peptídicos. Las proteínas son grandes polipéptidos y los dos términos se utilizan habitualmente de manera intercambiable.

En la presente descripción los términos “ácido nucleico”, “secuencia nucleica”, “secuencia de ácido nucleico”, “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “secuencia de polinucleótido” y “secuencia de nucleótidos”, utilizados de manera intercambiable, significa una secuencia precisa de nucleótidos, modificada o no, que define un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no nucleótidos no naturales, y que es un ADN bicatenario, un ADN monocatenario o productos de transcripción de dicho ADN.

Asimismo debe incluirse en la presente memoria que la presente invención no se refiere a secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en un estado natural. Las secuencias de la presente invención se han aislado y/o purificado, es decir, se han muestreado directa o indirectamente, por ejemplo mediante una copia, habiéndose modificado por lo menos parcialmente su entorno. Asimismo deben mencionarse en la presente memoria secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos aislados obtenidos mediante genética recombinante, por ejemplo, por medio de células hospedadoras, u obtenidas

mediante síntesis química.

En la presente descripción el término "cepa bacteriana" o "cepa" significa un subconjunto de una especie bacteriana que se diferencia de otras bacterias de la misma especie por alguna diferencia menor pero identificable. Por ejemplo, según la presente invención, las cepas de *P. acnes* pueden ser las cepas de *P. acnes* 6919, RON y/o PIE.

En la presente solicitud, el término "fragmento" se refiere a una parte de la secuencia, preferentemente la secuencia de aminoácidos.

En la presente descripción el término "fibrinógeno" o "Fg" se refiere a una glicoproteína involucrada en la formación de coágulos sanguíneos, que es un hexámero que contiene dos conjuntos de tres cadenas diferentes ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$ ), unidas entre sí por enlaces disulfuro. Las secciones N-terminales de estas tres cadenas contienen la cisteína que participa en la reticulación de las cadenas. Las partes C-terminales de las cadenas  $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$  contienen un dominio de aproximadamente 225 residuos de aminoácido, que pueden funcionar como unidad de reconocimiento molecular. Este dominio está implicado en interacciones proteína-proteína.

En la presente descripción el término "acné" o "acné común" se refiere a un trastorno habitual que presenta una patogenia multifactorial, incluyendo mecanismos hormonales, inmunológicos y microbiológicos. Esta enfermedad se localiza en el folículo pilosebáceo, lo que da como resultado lesiones clínicas tanto inflamatorias como no inflamatorias. La mayoría de los pacientes presentan una mezcla de comedones no inflamatorios y pápulas, pústulas y nódulos inflamatorios. Uno de los principales factores implicados en la formación del acné es la colonización microbiológica de la glándula sebácea. Varias líneas de evidencia han implicado un papel importante de *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) como agente etiológico en el acné y las infecciones debidas a dispositivos ortopédicos (Antti-poika 1990).

#### Polipéptido aislado para la utilización terapéutica según la invención

Para muchas bacterias patógenas, la invasión de las células hospedadoras está mediada por proteínas de superficie bacterianas o adhesinas que reconocen ligandos específicos. Las bacterias relacionadas con la piel, tales como *Staphylococcus* y *Streptococcus*, expresan numerosas adhesinas de superficie celular denominadas CSMRMAM (componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de matriz) que se unen específicamente a los componentes de la matriz extracelular (ECM) del huésped para fomentar su adhesión a las células diana y, posteriormente, para iniciar la colonización y la infección (Patti 1994). Los componentes de la ECM del huésped representan las dianas de adhesión microbiana ideales que muchos patógenos utilizan para la colonización de tejidos y el inicio de la infección.

Por tanto, en la presente invención, los inventores investigaron en primer lugar la interacción de proteínas de superficie de *P. acnes* con los componentes de ECM. Utilizando un ensayo de unión directa, los inventores demostraron por primera vez que el fibrinógeno humano reconoce específicamente una glicoproteína de 58 kDa. Esta proteína se ha denominado Pfg. El estudio de digestión con endoglicosidasa mostró que la interacción entre Pfg y fibrinógeno involucra la parte no glicosilada del fibrinógeno humano. Experimentos adicionales demostraron que la parte N-terminal del fibrinógeno es reconocida por Pfg y es capaz de inhibir la unión de Pfg a fibrinógeno.

Esta propiedad del fibrinógeno, en particular de su subunidad  $B\beta$ , para inhibir la adhesión de la proteína bacteriana a sus huéspedes puede utilizarse en terapia.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos el 80% con la SEC ID N°: 1 después de una alineación global óptima, o un fragmento de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos el 80% con cualquiera de las SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 después de una alineación global óptima, para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel. La presente descripción da a conocer de manera más general el mismo polipéptido aislado, para su utilización como medicamento.

SEC ID N°: 1 corresponde a la subunidad  $B\beta$  de fibrinógeno humano y las SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 corresponden a fragmentos de esta secuencia.

La cadena  $B\beta$  del fibrinógeno está codificada por el gen FGB, que es un gen que se encuentra en los seres humanos y en la mayoría de los demás vertebrados con un sistema de coagulación sanguínea similar. La secuencia de aminoácidos presenta una longitud de aproximadamente 450 aminoácidos.

Según una forma de realización, el polipéptido para la utilización terapéutica de la invención o tal como se da a conocer en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, preferentemente por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, más preferentemente por

lo menos el 96%, por lo menos el 97%, por lo menos el 98% o por lo menos el 99% con SEC ID N°: 1 después de una alineación global óptima, o una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos 80%, por lo menos 85%, preferentemente por lo menos 90%, por lo menos el 95%, más preferentemente por lo menos el 96%, por lo menos el 97%, por lo menos el 98% o por lo menos el 99% con las SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 después de una alineación global óptima.

En otra forma de realización, el polipéptido aislado para la utilización terapéutica según la invención o tal como se da a conocer en la presente memoria, se selecciona de las SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 o un polipéptido con por lo menos una identidad de por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, preferentemente por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, más preferentemente por lo menos el 96%, por lo menos el 97%, por lo menos el 98% o por lo menos el 99% con una de las SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 después alineación global óptima.

SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 47 corresponden a la secuencia de aminoácidos de un fragmento particular de la cadena B $\beta$  del fibrinógeno humano que presenta 106 aminoácidos y se denomina Fg1.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos significa el porcentaje de nucleótidos o residuos de aminoácido idénticos entre las dos secuencias que van a compararse, obtenido después de una alineación global óptima, siendo este porcentaje simplemente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre las dos secuencias aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación de dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se realiza tradicionalmente comparando las secuencias después de haberse alineado de manera óptima en su totalidad por toda su longitud, realizándose dicha comparación mediante cualquier software conocido por los expertos en la materia, tales como el software Needle que utiliza el parámetro «Gap open» (apertura de hueco) igual a 10.0, el parámetro «Gap extend» (extensión de hueco) igual a 0.5 y una matriz «Blosum 62». El software Needle está disponible, por ejemplo, en el sitio web ebi.ac.uk en todo el mundo bajo la denominación «Align».

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se determina entonces comparando las dos secuencias alineadas de manera global y óptima, en el que las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos que van a compararse pueden presentar sustituciones, adiciones o deleciones en comparación con la secuencia de referencia para una alineación global óptima entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones en las que el aminoácido o nucleótido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo el número de posiciones idénticas entre el número total de posiciones en la alineación global óptima y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Cuando se utiliza un software adecuado para una alineación global óptima, tales como el software Needle, el software calcula directamente el porcentaje de identidad entre las dos secuencias que van a compararse.

Para una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de por lo menos el 60% por lo menos el 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, preferentemente por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, más preferentemente por lo menos el 96%, por lo menos el 97%, por lo menos el 98% o por lo menos el 99% con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos incluyen aquellos que contienen determinadas modificaciones en la secuencia de referencia, particularmente deleción, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En el caso de sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, las sustituciones preferidas son aquellas en las que los aminoácidos sustituidos se reemplazan por aminoácidos "equivalentes". En la presente memoria, la expresión "aminoácido equivalente" pretende indicar cualquier aminoácido que es probable que se sustituya por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar, no obstante, las actividades biológicas del polipéptido de interés, e incluye particularmente los ejemplos específicos definidos a continuación.

Los aminoácidos equivalentes pueden determinarse o bien por su homología estructural con los aminoácidos por los que se sustituyen o bien basándose en los resultados de pruebas comparativas de actividad biológica entre los diversos anticuerpos que es probable que se generen.

Como ejemplos no limitativos, la tabla 1 a continuación resume las posibles sustituciones que es probable que se lleven a cabo sin dar como resultado una modificación significativa de la actividad biológica del polipéptido de interés; las sustituciones inversas son posibles naturalmente en las mismas condiciones.

Tabla 1

Residuo original	Sustitución/sustituciones
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser

Residuo original	Sustitución/sustituciones
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Los polipéptidos y fragmentos de los mismos descritos anteriormente reconocen la proteína de superficie de *P. acnes* (Pfg) caracterizada por los inventores, se unen a la misma e inhiben la adhesión de *P. acnes* a células de la piel.

5

En la presente invención, los inventores identificaron sorprendentemente una proteína de superficie de *P. acnes* (Pfg) de 58 kDa reconocida específicamente por fibrinógeno humano mediante la utilización de un ensayo de unión a ligando biotinilado. Se caracterizó además Pfg mediante electroforesis 2D y análisis de MALDI-ToF como una supuesta proteína de superficie de adhesión que contiene un motivo LPXTG en su extremo C-terminal. La Pfg se expresa principalmente durante la fase estacionaria del cultivo y parece estar altamente glicosilada conteniendo

10

residuos de GalNAc. La Pfg purificada reconoce fuertemente las subunidades A $\alpha$  y B $\beta$  de Fg. La desglicosilación enzimática específica de Fg mostró que la estructura principal de la proteína estaba involucrada en el proceso de reconocimiento.

15

Los inventores asimismo demostraron que la subunidad B $\beta$  de Fg y fragmentos de la misma son capaces de inhibir la interacción de la proteína de adhesión Pfg con su ligando diana (Fg) o células diana (células de la piel). En particular, los polipéptidos y fragmentos de los mismos tal como se describieron anteriormente permiten competir con esta interacción y, por tanto, participar en la prevención de la adhesión bacteriana a células hospedadoras.

20

Además de esta capacidad, los polipéptidos y fragmentos de los mismos tal como se describieron anteriormente pueden utilizarse como fármaco, particularmente en la invención para tratar y/o prevenir el acné.

Los inventores asimismo descubrieron que los polipéptidos y fragmentos de los mismos tal como se describieron anteriormente presentan propiedades antiinflamatorias generales, indeciblemente de la presencia de *P. acnes*, y por tanto puede utilizarse como fármaco, particularmente en la invención para tratar y/o prevenir otras enfermedades inflamatorias de la piel, preferentemente psoriasis.

25

Tal como se utiliza en la presente memoria "enfermedades inflamatorias de la piel" son enfermedades que se presentan en muchas formas, desde erupciones ocasionales acompañadas de picazón y enrojecimiento de la piel, hasta afecciones crónicas tales como dermatitis (eccema), rosácea, dermatitis seborreica y psoriasis. La inflamación de la piel puede caracterizarse como aguda o crónica. La inflamación aguda puede resultar de la exposición a la radiación UV (UVR), radiación ionizante, alérgenos o al contacto con irritantes químicos (jabones, tintes para el cabello, etc.). Este tipo de inflamación se resuelve normalmente en el plazo de 1 a 2 semanas con poca destrucción tisular acompañante. Por el contrario, la inflamación crónica es el resultado de una respuesta inflamatoria sostenida mediada por células inmunitarias dentro de la propia piel. Esta inflamación es de larga duración y puede provocar una destrucción tisular importante y grave.

30

35

Tal como se utiliza en la presente memoria "psoriasis" significa una enfermedad sistémica común, crónica, recidivante/remitente, mediada por el sistema inmunitario, caracterizada por lesiones de la piel incluyendo manchas, pápulas y placas rojas, escamosas, que generalmente producen picor. Las lesiones de la piel que se observan en la psoriasis pueden variar en cuanto a gravedad, desde pequeñas manchas localizadas hasta una cobertura corporal completa. Los cinco tipos principales de psoriasis son en placa, en gotas (*guttata*), inversa, pustulosa y eritrodérmica.

40

#### Fragmentos específicos de la invención

45

Partiendo de la secuencia de la subunidad B $\beta$  del fibrinógeno, los inventores identificaron fragmentos específicos capaces de unirse a la proteína de adhesión Pfg de *P. acnes* y así inhibir la adhesión de *P. acnes* a su proteína diana (fibrinógeno) y a células de la piel del huésped.

En otro aspecto, la presente invención se refiere así a un fragmento de 5 a 20 aminoácidos de SEC ID N°: 1, comprendiendo dicho fragmento una secuencia de aminoácidos seleccionada de una de las SEC ID N°: 7 a 12, o un fragmento seleccionado de las SEC ID N°: 2, 5 y 13 y 47. De manera más general, la descripción da a conocer un fragmento de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos el 80% con la SEC ID N°: 1 después de una alineación global óptima, comprendiendo dicho fragmento una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos el 80% con una cualquiera de las SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 después de una alineación global óptima.

Para obtener estos fragmentos específicos, la subunidad B $\beta$  de fibrinógeno humano se dividió en cuatro segmentos que presentaban la misma longitud (denominados Fg1, Fg2, Fg3 y Fg4) y se clonaron y produjeron en vectores bacterianos. Las secuencias de aminoácidos de la subunidad B $\beta$  de fibrinógeno y de estos fragmentos se muestran en la tabla 2a a continuación.

Tabla 2a: secuencias de aminoácidos de la subunidad B $\beta$  del fibrinógeno y de los fragmentos Fg1, Fg2, Fg3 y Fg4.

Nombre del fragmento	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°:
Subunidad B $\beta$ del fibrinógeno	MKRMVSWSFH KLKTMKHL LLLCVFLVKS QGVNDNEEGF FSARGHRPLD KKREEAPSLR PAPPISGGG YRARPAAAA TQKKVERKAP DAGGCLHADP DLGVLCP TGC QLQEALLQEQ RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSSFQMYL LKDLWQKRQK QVKDNENVVN EYSSELEKHQ LYIDETVNSN IPTNLRVLR ILENLRSKI Q KLESDVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVS GKE CEEIIRKGGE TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENGGWT VIQNRQDGSV DFGRKWDPYK QGFGNVATNT DGKNYCGLP EYWLGN DKIS QLTRMGPT EL LIEMEDWKGD KVKAHYGGFT VQNEANKYQI SVNKYRG TAG NALMDGASQL MGENRTMTIH NGMFFSTYDR DNDGWL TSDPRKQCSKEDGG GWWYNRCHAA NPNGRYYWGG QYTWDMAKHG TDDGVVWMNW KGSWYSMRKM SMKIRPFFPQ Q	SEC ID N°:1
Fg1	MKRMVSWSFHKLKTMKHL LLLLCVFLVKSQGVNDNEEGFFSARGHRPLDK KREEAPSLRPAPPISGGGRARPAKAAATQKKVERKAPDAGGCLHADPDLGV LCMKRMVSWSFHKLKTMKHL LLLLCVFLVKSQGVNDNEEGFFSARGHRPLDKK REEAPSLRPAPPISGGGYRARPAAKAAATQKKVERKAPDAGGCLHADPDLGVLC	SEC ID N°:13
Fg1	MKRMVSWSFHKLKTMKHL LLLLCVFLVKSQGVNDNEEGFFSARGHRPLDKK REEAPSLRPAPPISGGGYRARPAAKAAATQKKVERKAPDAGGCLHADPDLGVLC	SEC ID N°: 47
Fg2	DAGGCLHADP DLGVLCP TGC QLQEALLQEQ RPIRNSVDEL NNNVEAVSQT SSSSFQMYL LKDLWQKRQK QVKDNENVVN EYSSELEKHQ LYIDETVNSN IPTNLRVLR ILENLRSKI Q KLESDVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVS	SEC ID N°:14
Fg3	KLESDVSAQM EYCRTPCTVS CNIPVVS GKE CEEIIRKGGE TSEMYLIQPD SSVKPYRVYC DMNTENGGWT VIQNRQDGSV DFGRKWDPYK QGFGNVATNT DGKNYCGLP EYWLGN DKIS QLTRMGPT EL LIEMEDWKGD KVKAHYGGFT VQNE	SEC ID N°:15
Fg4	PTELLIEMED WKGDKVKAHY GGFTVQNEAN KYQISVNKYR GTAGNALMDG ASQLMGENRT MTHNGMFFS TYDRDNDGWL TSDPRKQCSK EDGGGWWYNR CHAANPNRY YWGGQYTWDMAKHG TDDGVV WMNWKGSWYS MRKMSMKIRP FFPQ	SEC ID NO;16

Después de las pruebas, parece que entre los fragmentos Fg1, Fg2, Fg3 y Fg4, el fragmento activo es Fg1.

Además, el fragmento Fg1 se dividió en primer lugar en tres fragmentos no solapantes (Fg1.1, Fg1.2 y Fg1.3, que se muestran en la tabla 2b) que presentaban aproximadamente la misma longitud (35, de 35 y 36 aminoácidos, respectivamente) y después de eso se rodeó cada área de corte por 15 aminoácidos permitiendo obtener otros dos fragmentos (Fg1.4 y Fg1.5, mostrados en la tabla 2b) que presentaban la misma longitud de 30 aminoácidos y solapantes con los fragmentos Fg1.1, Fg1.2 y Fg1.3.

Después de las pruebas, parece que entre los fragmentos Fg1.1, Fg1.2, Fg1.3, Fg1.4 y Fg1.5, los fragmentos

activos son Fg1.1 y Fg1.4.

El fragmento Fg1.1 se dividió adicionalmente en otros seis fragmentos (Fg1.1.1, Fg1.1.2, Fg1.1.3, Fg1.1.4, Fg1.1.5 y Fg1.1.6, que se muestran en la tabla 2b).

5

Tabla 2b: secuencias de aminoácidos de fragmentos derivados de Fg1 y Fg1.1.

Nombre de fragmentos	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°:
Fg1.1	MKRMVSWSFHKLKTMKHLLLLLLCVFLVKSQGVND	SEC ID N°: 2
Fg1.2	NEEGFFSARGHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGG	SEC ID N°: 3
Fg1.3	YRARPAKAAATQKKVERKAPDAGGCLHADPDLGVLC	SEC ID N°: 4
Fg1.4	LLLCVFLVKSQGVNDNEEGFFSARGHRPLD	SEC ID N°: 5
Fg1.5	APSLRPAPPPISGGGYRARPAKAAATQKKV	SEC ID N°: 6
Fg1.1.1	LLLCVFLVKSQGVND	SEC ID N°: 7
Fg1.1.2	LLLCV	SEC ID N°: 8
Fg1.1.3	FLVKS	SEC ID N°: 9
Fg1.1.4	QGVND	SEC ID N°: 10
Fg1.1.5	LLLCVFLV	SEC ID N°: 11
Fg1.1.6	KSQGVND	SEC ID N°: 12

Con el fin de adaptar el fragmento de la invención para una utilización más eficaz en terapia y potenciar su síntesis a un coste mínimo, los inventores proporcionan fragmentos que presentan una longitud reducida.

10

Por tanto, los fragmentos dados a conocer en la presente memoria presentan una longitud de no más de 150 aminoácidos, no más de 130, preferentemente no más de 110 o no más de 90 aminoácidos.

Un fragmento de la invención presenta una longitud de 106 aminoácidos correspondiente a SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 47 (fragmento Fg1).

15

Más preferentemente, los fragmentos dados a conocer en la presente memoria presentan una longitud comprendida entre 5 y 50 aminoácidos, preferentemente entre 5 y 40, más preferentemente entre 5 y 35. Los fragmentos dados a conocer en la presente memoria pueden presentar una longitud comprendida entre 25 y 40 aminoácidos, preferentemente entre 30 y 35 aminoácidos.

20

Los fragmentos dados a conocer en la presente memoria pueden presentar y los fragmentos según la invención que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de una de las SEC ID N°: 7 a 12 presentan una longitud comprendida entre 5 y 20 aminoácidos, preferentemente entre 5 y 15 y más preferentemente entre 5 y 10 aminoácidos.

25

Preferentemente, los fragmentos según la invención presentan secuencias correspondientes a las SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 12, más preferentemente las SEC ID N°: 2 y 5

30

#### Ácidos nucleicos aislados, vectores y células hospedadoras según la invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el fragmento según la invención.

35

Las secuencias de ácidos nucleicos asimismo pueden mostrar un porcentaje de identidad de por lo menos el 60% por lo menos el 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, preferentemente por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, más preferentemente por lo menos el 96%, por lo menos el 97%, por lo menos el 98% o por lo menos el 99%, después de una alineación global óptima con una secuencia preferida. Significa que las secuencias nucleicas muestran, con respecto a la secuencia nucleica de referencia, determinadas modificaciones tales como, en particular, una delección, un truncamiento, una extensión, una fusión química y/o una sustitución, particularmente puntual. Preferentemente, se trata de secuencias que codifican la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de referencia, estando esto relacionado con la degeneración del código genético, o secuencias de complementariedad que es probable que se hibriden específicamente con las secuencias de referencia, preferentemente en condiciones muy rigurosas.

45

La invención asimismo proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención.

El término "vector", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un vector de "plásmido",

50

que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de producir replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que presentan un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y, por tanto, se replican junto con el genoma del huésped.

El vector según la invención asimismo contiene preferentemente elementos necesarios para permitir el suministro, la propagación y/o expresión de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria dentro de una célula o un sujeto huésped. En particular, en el vector según la invención, la molécula de ácido nucleico según la invención preferentemente está unida operativamente a secuencias reguladoras apropiadas. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "elementos reguladores" o "secuencia reguladora" se refieren a cualquier elemento que permite, contribuye o modula la expresión de la(s) molécula(s) de ácido nucleico en una determinada célula o sujeto huésped, incluyendo replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme, traducción, estabilidad y/o transporte del/de los ácido(s) nucleico(s) o su derivado (es decir, ARNm). Los expertos en la materia apreciarán que la elección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como el propio vector, la célula o el sujeto huésped, el nivel de expresión deseado, etc.

Los ejemplos representativos de tales vectores de plásmido adecuados, utilizados en la invención, incluyen, sin limitación, vector pBSK, vectores pET, pDEST, pRSET en procariotas; pYES en levaduras; pDEST, pcDNA en eucariotas.

Además, las moléculas de ácido nucleico de la invención y los vectores de la invención que comprenden estas moléculas pueden utilizarse para la transformación de una célula hospedadora adecuada. El término "célula hospedadora", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende hacer referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante para expresar los polipéptidos o fragmentos de la invención. Debe entenderse que tales términos están destinados a referirse no sólo a la célula objeto particular sino asimismo a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debidas o bien a mutaciones o bien a influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida dentro del alcance del término "célula hospedadora" tal como se utiliza en la presente memoria. Los ejemplos no limitativos de células hospedadoras adecuadas en el contexto de la presente invención incluyen células bacterianas, tales como *E. coli* (en particular, la cepa DH5alfa), células de levadura (en particular, *Saccharomyces cerevisiae*), células de mamíferos (en particular, líneas celulares HeLa, CHO, 3T3).

La transformación puede realizarse mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora. Tales métodos se conocen bien por los expertos en la materia e incluyen transformación mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por Polybrene, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido en liposomas, inyección biolística y microinyección directa de ADN en núcleos.

La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos o más moléculas de ácido nucleico o vectores de expresión, incluido el vector que expresa el polipéptido o fragmento de la invención.

#### Composición farmacéutica, fármaco y producto de combinación.

Los inventores demostraron que los fragmentos de la presente invención, preferentemente los fragmentos que presentan secuencias de aminoácidos correspondientes a SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47, reconocen y se unen a la proteína de adhesión Pfg de *P. acnes*, inhibiendo así la adhesión de *P. acnes* a su ligando diana (fibrinógeno) y a células de la piel del huésped.

En otro aspecto, la presente invención se refiere así a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto seleccionado del fragmento, la molécula de ácido nucleico aislada, el vector o la célula hospedadora según la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, tampones, soluciones salinas, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. El tipo de vehículo puede seleccionarse basándose en la vía de administración pretendida. En diversas formas de realización, el portador es adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, transdérmica u oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Puede prepararse una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa que contenga 250 ml de solución de Ringer estéril y 100 mg de la combinación. Los métodos reales para preparar compuestos

administrables por vía parenteral los conocerán o resultarán evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 17a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania (1985), y las ediciones 18ª y 19ª del mismo. El compuesto de la composición se formula preferentemente en una cantidad eficaz. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado deseado, tal como la prevención o el tratamiento de trastornos inflamatorios de la piel, en particular acné. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para influir en el transcurso terapéutico de un estado de enfermedad particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz es asimismo aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan los efectos tóxicos o perjudiciales del agente.

Se entiende que las vías de administración, los esquemas de dosificación y las formas galénicas óptimas pueden determinarse según los criterios tenidos en cuenta generalmente al establecer un tratamiento adecuado para un paciente tal como, por ejemplo, la edad del paciente, la gravedad de su estado general, su tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios experimentados.

Por ejemplo, el fragmento, la molécula de ácido nucleico aislada, el vector o la célula hospedadora según la presente invención pueden estar presentes en la composición farmacéutica según la invención en los intervalos de desde el 0.1 hasta el 10% en peso/peso (p/p), preferentemente desde el 0.5 hasta el 2% p/p, más preferentemente desde el 0.5 hasta el 4% p/p, incluso más preferentemente desde el 2 hasta el 6% p/p.

Según otro aspecto, la invención se refiere a la molécula de ácido nucleico aislada, el vector, la célula hospedadora o la composición farmacéutica según la invención, para su utilización como medicamento.

En una forma de realización preferida, la molécula de ácido nucleico aislada, el vector, la célula hospedadora o la composición farmacéutica según la invención se utilizan en el tratamiento y/o la prevención del acné.

Los inventores asimismo han demostrado que la molécula de ácido nucleico aislada, el vector, la célula hospedadora o la composición farmacéutica según la invención, pueden utilizarse en el tratamiento y/o la prevención de otras enfermedades inflamatorias, preferentemente psoriasis.

El fragmento, la molécula de ácido nucleico aislada, el vector, la célula hospedadora o la composición farmacéutica según la invención, pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes antiinflamatorios para potenciar su efecto terapéutico.

En otro aspecto, la presente invención asimismo se refiere a un producto de combinación, que comprende:

- al menos un compuesto seleccionado del fragmento, la molécula de ácido nucleico aislada, el vector y la célula hospedadora según la invención; y
- otro agente farmacéutico, utilizado preferentemente para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel seleccionadas de psoriasis y/o acné, preferentemente acné;

para la utilización simultánea, independiente o secuencial como medicamento.

Tales otros agentes farmacéuticos pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en doxiciclina, isotretinoína, tretinoína, adapaleno, peróxido de benzoilo, clindamicina y eritromicina.

## Ejemplos

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

La cepa de *P. acnes* 6919 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) y se aislaron RON y PIE de *P. acnes* de pacientes con infección articular. Se cultivaron todas las cepas en condiciones anaerobias en medio reforzado para clostridios (RCM) sólido y líquido (Difco Laboratories, Detroit, MI). Se transfirió *P. acnes* de la reserva bacteriana sobre una placa de agar RCM y se incubó durante 5 días en condiciones anaerobias utilizando un sistema de recipiente anaerobio GasPak™ EZ (Becton Dickinson & Co, Sparks MD, EE.UU.). Se transfirió una única colonia a 100 ml de RCM y se cultivó tal como se describió anteriormente. Entonces se almacenó la suspensión bacteriana congelada a -80°C en presencia de glicerol al 10% final. Esta reserva se denominó «reserva inicial» y se utilizó para todos los experimentos. Para el cultivo de rutina, se utilizaron 100 ml de RCM o RCM complementado con Tween 80 al 0.1% (RCM + T80) y se recogieron las bacterias después de 5 días a 37°C mediante centrifugación a 7.000 X g durante 10 min a 4°C. se agruparon los sedimentos y lavaron en aproximadamente 30 ml de PBS frío y se centrifugaron de nuevo tal como se describió anteriormente. Finalmente, se suspendió el sedimento bacteriano en PBS [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,7 mM, NaCl 0.15

M (pH 7.4)] (1:10 cultivo en volumen). Asimismo se hicieron crecer bacterias asimismo sobre agar Columbia complementado con el 5% de sangre de oveja durante 5-8 días a 37°C en condiciones anaerobias tal como se describió anteriormente. Se descartaron las bacterias en PBS (3 ml de PBS por placa de Petri) y se utilizaron para la extracción de proteínas de superficie. Para una gran cantidad de cultivo, se utilizaron 200 ml de un cultivo en RCM de *P. acnes* de 5 días de antigüedad como inóculo para 2 litros de RCM previamente equilibrado a 37°C. Para garantizar las condiciones anaerobias, se lavó el cultivo extensamente con N<sub>2</sub> durante 10 min y se selló. Cada 2 h, se recogieron 10 ml de cultivo para medir la absorbancia a 600 nm y el pH, y se enjuagó el cultivo con N<sub>2</sub> tal como se describió anteriormente. Se centrifugaron las bacterias a 7.000 X g durante 10 min y se resuspendió el sedimento en PBS. Se obtuvo el extracto de proteína de superficie total tal como se describe a continuación.

#### Extracción de proteína de superficie total

Se extrajeron térmicamente proteínas de superficie en PBS sola o en presencia de SDS al 2% a 60°C durante 20 min o en presencia de LiCl al 1% a 45°C durante 2 h (Shen 1993). Se retiraron las bacterias mediante centrifugación a 16.000 X g durante 20 min a 4°C. Se retiró el exceso de SDS y LiCl con diálisis frente a PBS. La disolución resultante se denominó extracto térmico de *P. acnes* (PAHE) y se sometió a precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación durante 1 h con agitación a 4°C para su concentración. Se recuperaron las proteínas precipitadas después de centrifugación a 22.000 X g durante 30 min a 4°C, luego se resuspendieron en PBS y se dializaron extensamente frente a PBS. Esta disolución de proteína se denominó extracto térmico de *P. acnes* concentrada (cPAHE). La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry utilizando BSA como patrón descrito por Peterson (Peterson 1983).

#### Biotinilación

Se ajustaron cPAHE, Pfg purificada y ligandos de ECM comerciales a la concentración de 1 a 10 mg/ml en PBS y se dializaron frente a [tetraborato de sodio 74 mM, ácido bórico 60 mM (pH 8,8)] durante la noche a 4°C. se recuperaron las bacterias *P. acnes* completas en PBS tal como se describió anteriormente y se resuspendió el sedimento en el tampón borato. Esta operación se repitió dos veces. Se incubaron proteínas y bacterias completas utilizando el reactivo de marcaje extrínseco sulfo-N-hidroxisuccinimida (NHS)-biotina (Sigma) en una razón de 250 µg de NHS-biotina por 1 mg de proteína durante 4 h a 4°C con agitación por volteo. Se detuvo la reacción añadiendo NH<sub>4</sub>Cl 1 M. Se retiró el exceso de biotina-NHS mediante diálisis frente a PBS a 4°C para las disoluciones de proteínas y mediante centrifugación para las bacterias completas. Se almacenaron las preparaciones de proteínas biotiniladas a -80°C y se almacenaron las bacterias biotiniladas a + 4°C antes de su utilización. La preparación de bacterias biotiniladas no se utilizó más de 5 días después de las preparaciones.

#### Actividad de unión.

Para caracterizar la interacción entre *P. acnes* y ligandos, se utilizaron moléculas biotiniladas en ensayos cuantitativos y cualitativos. En un primer conjunto de ensayos, se utilizaron ligandos de ECM (fibrinógeno, colágenos I, IV, VI y VIII) como proteínas marcadas con biotina. En un segundo conjunto de ensayos, se biotinilaron proteínas de superficie de *P. acnes* (extracto total y Pfg purificada). *Para análisis cuantitativo*, se diluyó la proteína no marcada en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9.6 para producir una concentración de proteína que oscilaba entre 0.01 y 50 µg/ml, y luego se inmovilizó en placas de poliestireno de 96 pocillos a 4°C durante la noche. Se enjuagaron los pocillos tres veces con 0.2 ml de PBS que contenía Tween-20 al 0.05% (PBS-Tween). Se añadieron proteínas biotiniladas (de 0.01 a 16 µg/ml en PBS-Tween) a los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se enjuagaron los pocillos tres veces con 0.2 ml de PBS-Tween. Se añadió peroxidasa conjugada con estreptavidina (0.5 µg/ml en PBS-Tween) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Después del lavado, se detectó la peroxidasa unida utilizando el sustrato de peroxidasa cromogénico ABTS. Para el análisis cualitativo, se separaron las proteínas no marcadas (10-75 µg por carril) mediante SDS-PAGE y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro de 0.45 µm), tal como se describió previamente (Towbin, 1979). Luego se saturaron las membranas durante la noche a 4°C en PBS que contenía BSA al 5%, Tween-20 al 0.05% (tampón PBT). Se detectó la actividad de unión incubando las membranas con 20 ml de PBT que contenía proteínas biotiniladas (0.1 µg/ml) durante 2 h a temperatura ambiente seguido de tres lavados con PBT. Se detectaron las proteínas biotiniladas unidas incubando la membrana con peroxidasa conjugada con estreptavidina (0.5 µg/ml en PBT) durante 1 h a temperatura ambiente. Después del lavado, se detectó la actividad peroxidasa unida utilizando 3,3'-diaminobencidina en presencia de CoCl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Harlow y Lane, 1988).

#### Electroforesis bidimensional

Se rehidrató un gradiente de pH inmovilizado de pH 10-3 de 13 cm (tira de IPG) (Amersham-Bioscience, Suecia) a 20°C durante 13 h con 250 µl de disolución de IEF (urea 8 M-CHAPS al 2% (peso/volumen) - tampón IPG al 0.5%, pH 4-7 (vol/vol)-azul de bromofenol al 0.002%) que contenía 200 µg de proteínas de cPAHE. Se realizó isoelectroenfoque a 20°C en cuatro etapas, 1 h a 200 V, 1 h a 500 V, 30 min a 8000 V en un modo de gradiente y 3 h a 8000 V utilizando el sistema Ettan IPGphor (Amersham-Pharmacia, Suecia). Para la segunda dimensión, se equilibró la tira de IPG durante 15 min haciendo oscilar en una disolución de urea 6 M-glicerol al 30% (peso/volumen)-Tris-HCl 0.05 M-SDS al 2% (peso/volumen) -azul de bromofenol al 0.002%-DTT 100 mM y durante

15 min en una disolución de urea 6 M-glicerol al 30% (peso/vol)-Tris-HCl 0.05 M-SDS al 2% (peso/vol)-azul de bromofenol al 0.002%-yodoacetamida 400 mM. Luego, se aplicó la tira de IPG sobre un gel SDS-PAGE al 12%. Normalmente, se hicieron correr 2 geles en paralelo durante 6 horas a una corriente de 70 mA constante. Se detectaron las proteínas en un gel mediante tinción con plata sin con etapa de glutaraldehído. Se visualizó la mancha de interés utilizando BOA tal como se describió anteriormente. Se hicieron coincidir los geles teñidos con plata y las membranas y se escindieron del gel las manchas de interés.

#### Huella peptídica mediante espectrometría de masas de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI)-tiempo de vuelo (ToF)

Se llevó a cabo digestión triptica en gel de manchas de proteína bidimensionales en tampón bicarbonato de amonio 25 mM (pH 8,0) que contenía acetonitrilo al 50% (vol/vol) antes de secado a vacío (Jonsson 2001). Se realizó rehidratación con tampón bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8,0) que contenía 0.02 g/l de tripsina porcina modificada de calidad para secuenciación (Promega, Madison, Wis.) y se realizó la digestión durante 18 h a 37°C y se detuvo mediante la adición de ácido trifluoroacético al 0.4 % (vol/vol). Se aplicó la disolución de péptido recuperada como puntos sobre la película de matriz y se permitió que se secase a temperatura ambiente. Se enjuagaron depósitos de muestra con agua pura y posteriormente se insertaron en el espectrofotómetro de masas MALDI (Applied Biosystems, Voyager DE super STR) equipado con un láser de N<sub>2</sub> de 337 nm. Se produjeron películas de matriz de evaporación rápida tal como se describió previamente (Vorm, 1994) utilizando una disolución saturada de ácido 4-hidroxi- $\alpha$ -cianocinámico (Sigma) en acetona. Se realizó una calibración de masa interna de todos los espectros utilizando el péptido de autodigestión de tripsina porcina. Se hizo una búsqueda de las masas peptídicas en las bases de datos SWISS-PROT y Genpept.

#### Purificación de pfg

Se centrifugaron cPAHE (90 mg en 16 ml) a 5.000 X g durante 10 min a temperatura ambiente para retirar el material no solubilizado y se fraccionaron mediante cromatografía de intercambio aniónico realizada en una columna de intercambio aniónico UNOsphere Q (2,5 por 10 cm) (BioRad) equilibrada en el tampón A [Tris 25 mM (pH 8,0)] a una velocidad de flujo de 24 ml/h. Se lavaron las proteínas no unidas con tampón A (24 ml) y se eluyeron gradualmente las proteínas unidas con de 0 a 160 (28 ml), de 160 a 200 mM (40 ml) con tampón A + NaCl 2 M. Se agruparon las fracciones (1.5 ml) que contenían actividad de unión a Fg, se desalaron mediante diálisis extensa a 4°C frente al tampón NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.1 M, pH 8,0 y se liofilizaron. Se logró la purificación final de Pfg cargando 3 mg de proteína en un volumen de 5 ml en una columna Sephacryl S-300 HR (1 por 120 cm) (GE Healthcare) equilibrada con NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.1 M, pH 8,0 a una velocidad de flujo de 6 ml/h (1.5 ml/fracción) durante un periodo de 24 h. Se agruparon las fracciones (1.5 ml) que contenían actividad de unión a Fg y se almacenaron a -20°C.

#### Desglicosilación de fibrinógeno

Para evaluar qué parte del fibrinógeno es reconocida por proteínas de superficie de *P. acnes*, se ha retirado enzimáticamente la parte de glucano para preservar la integridad de la estructura principal de la proteína. Puesto que se ha demostrado que el fibrinógeno es una glicoproteína que contiene glicanos unidos tanto a N como a O (Debeire 1985; Reid Townsend 1982; L'Hôte 1996), se utilizaron las endoglicosidasas, N-glicanasa y O-glicanasa para retirar glicanos. Todas las enzimas y los reactivos utilizados se adquirieron de ProZyme (Prozyme, San Leandro, Calif.). Se desnaturalizó Fg humano y bovino comerciales purificados (100 µg; Sigma) a 100°C durante 5 min, conteniendo el tampón [SDS al 0.4%,  $\beta$ -mercaptoetanol 200 mM, fosfato de sodio 50 mM (pH 7.0)], se enfriaron a temperatura ambiente y luego se añadió NP-40 al 3%. Para retirar los glicanos unidos a N, se añadieron 0.5 U de *Flavobacterium meningosepticum* recombinante en PNGasa F de *Escherichia coli* (N-glicanasa) y se incubaron durante 24 h a 37°C, volumen final de 50 µl. Para retirar los glicanos unidos a O, en primer lugar se incubó fibrinógeno humano desnaturalizado en presencia de 0.25 U de sialidasa A de *Vibrio cholerae*,  $\beta$ -galactosidasa de testículos bovinos y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de harina de judía sable durante 3 h a 37°C, ya que deben retirarse los monosacáridos hasta que sólo quede el núcleo de Gal $\beta$  (1-3)GalNAc unido a la proteína. Entonces, se añadieron 0.5 U de *Streptococcus pneumoniae* recombinante en endo- $\alpha$ -N-acetil-gactosaminidasa (O-glicanasa) de *Escherichia coli* y se incubó durante 24 h a 37°C. Se detuvieron las reacciones enzimáticas mezclando la muestra con el tampón de muestra de electroforesis, seguido por una desnaturalización a 100°C durante 3 min. Luego, se sometió a prueba la capacidad de Fg N- y O-desglicosilado para unirse a Pfg biotinilada utilizando el ensayo de unión descrito anteriormente. Se monitorizó la reacción de desglicosilación con respecto a los cambios de movilidad de los fibrinógenos antes y después de la desglicosilación en SDS-PAGE después de la tinción con azul de Coomassie. Asimismo se logró la monitorización utilizando lectinas vegetales de tipo jacalina y RCA-I tal como se describe a continuación.

#### Construcciones de plásmidos

Se obtuvieron fragmentos de la subunidad B $\beta$  del fibrinógeno humano mediante RT-PCR a partir de ARN total extraído de la línea celular de hepatoma humano Hep-G2 cultivada en medio de Dulbecco modificado complementado con suero de ternero fetal al 10%. En resumen, se aisló el ARN total con reactivo TRIzol (Invitrogen

Ltd, Paisley, R.U.) según las instrucciones del fabricante y se trató con ADNasa I (Roche Molecular Biochemical). Se determinó la concentración de ARN mediante el valor de  $A_{260}$  de la muestra. Se generó ADN complementario a partir de 2 µg de ARN total utilizando el cebador de oligo(dT) y 200 U de transcriptasa inversa SuperScript™ II (Invitrogen Ltd., Paisley, R.U.) y luego se utilizó como molde para la reacción de PCR convencional. Se llevó a cabo la amplificación convencional utilizando 0.5 U de ADN polimerasa Platinum® Pfx de alta fidelidad (Invitrogen Ltd., Paisley, R.U.) en un volumen final de 25 µl con las condiciones de ciclos ajustadas a 94°C durante 15 s, 50°C durante 30 s y 68°C durante 45 s para un total de 35 ciclos. Los cebadores amplificaron unos fragmentos de 318, 441, 462 y 462 pb de ADNc de fibrinógeno.

Se utilizaron los pares específicos de cebadores de la siguiente manera:

GCAGGAATTCTGATGAAAAGGATGGTTTCTTGG (SEC ID N°: 17) y

GGCCGCTCGAGTACACAACACCCCCAGGTCTGG (SEC ID N°: 18) para Fg1;

GCAGGAATTCTGGATGCTGGAGGCTGTCTTCAC (SEC ID N°: 19) y

GGCCGCTCGACTAGACACCACAGGAATATTGCA (SEC ID N°: 20) para Fg2;

GCAGGAATTCTGAAGTTAGAATCTGATGTCTCA (SEC ID N°: 21) y

GGCCGCTCGAGTTTCATTCTGTACAGTGAATCC (SEC ID N°: 22) para Fg3;

GCAGGAATTCTGCCCACAGAACTTTTGATAGAA (SEC ID N°: 23) y

GGCCGCTCGAGTCTGTGGGAAGAAGGGCCTGAT (SEC ID N°: 24) para Fg4.

Se añadieron sitios de restricción de EcoRI y XhoI a los cebadores sentido y antisentido, respectivamente. Se purificaron fragmentos de PCR de fibrinógeno y se insertaron en primer lugar en el vector pBSK. Después de la digestión de los fragmentos con EcoRI/XhoI, se insertaron los fragmentos en pGEX-4T-2 digerido con EcoRI y XhoI.

#### Expresión y purificación de las proteínas de fusión de GST

Se utilizó la cepa de *E. coli* BL21DE3pLys para producir las diferentes proteínas de fusión GST-fragmento de fibrinógeno. Se hicieron crecer bacterias durante la noche en medio LB (10 ml) complementado con 100 µg/ml de ampicilina y 40 µg/ml de cloranfenicol y se utilizaron para inocular 1 l de medio LB. Cuando el cultivo incubado a 30°C alcanzó una  $DO_{650} = 0.7$ , se indujo la expresión de la proteína añadiendo isopropil- $\alpha$ -D-tiogalactósido (IPTG) 0.5 mM y se prolongó el cultivo durante otras 4 h. Se recogió el cultivo mediante centrifugación a 5000 X g durante 10 min. Se lavó el sedimento una vez en PBS y se resuspendió en un tampón de lisis TEN-T (TrisHCl 20 mM, pH: 7.5, EDTA 0.5 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%) se sonicó durante 30 segundos por ráfagas sobre hielo y se complementó con DTT 2 mM, N-lauril sarcosina al 1.5%. Se centrifugó el lisado durante 20 min a 20000 X g y se desechó el sobrenadante. Se disolvió la fracción de sedimento insoluble que contenía la proteína de fusión de GST en tampón TEN-T + urea 8 M y se clarificó la disolución mediante centrifugación durante 20 min a 20.000 X g. Se cargó la proteína solubilizada en la columna Protino GST/4B (Macherey & Nagel) y se eluyó utilizando el tampón Tris 50 mM, glutatión 10 mM, pH 8.0. Se agruparon las fracciones que contenían péptido recombinante (determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio). En una etapa final, justo antes de la utilización, el sobrenadante se dializó frente a PBS para retirar la urea.

#### Cultivo y estimulación celular

Se hicieron crecer la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT, fibroblastos MRC5 en medio de Eagle modificado por Dulbecco-Glutamax-I (DMEM) con piruvato de sodio 1 mM. Se hizo crecer la línea celular monocítica humana inmortalizada ThP1 en medio del Instituto Roswell Park Memorial 1640-Glutamax-I (RPMI). Se complementaron DMEM y RPMI con suero de ternero fetal inactivado por calor al 0.1% y al 10% (Invitrogen) y una disolución antibiótica/antimicótica (penicilina 10 U/ml, estreptomycin 10 µg/ml, anfoterina 0.25 µg/ml) a 37°C en atmósfera humidificada que contenía el 5% de CO<sub>2</sub> tal como se describió (Life Technologie). Se hicieron crecer queratinocitos humanos primarios (NHDK) y fibroblastos (HDF) en el medio KGM-Gold y en el kit Bullet FGM-2 tal como se describe por el fabricante, respectivamente (Lonza). Se sometieron a prueba las líneas celulares inmortalizadas de manera rutinaria para evaluar la ausencia de infección por *Mycoplasma*.

Para experimentos de estimulación con *P. acnes*, se incubaron células con la suspensión de *P. acnes* ajustada a

la concentración apropiada, se pretrató o no durante 1 h a 37°C con los péptidos recombinantes de fibrinógeno Fg1 y Fg2 a las concentraciones 0.87, 1.75, 3.5 o 7  $\mu$ M durante el periodo de tiempo deseado a 37°C en el 5% de CO<sub>2</sub>.

- 5 Para experimentos de estimulación con LTA (ácido lipoteicoico), PGN (peptidoglicano) o LPS (lipopolisacáridos), se pretrataron o no células con los péptidos recombinantes de fibrinógeno Fg1 y Fg2 a las concentraciones 7, 3.5 o 1.75  $\mu$ M durante 24 h a 37°C en el 5% de CO<sub>2</sub> y luego se estimularon con LTA o PGN o LPS a la concentración final de 10  $\mu$ g/ml durante 18 h a 37°C.
- 10 Para experimentos utilizando un modelo *in vitro* de psoriasis, se hicieron crecer queratinocitos humanos primarios cutáneos (NHDK) en medio de cultivo durante 24 horas. Luego, se trataron las células o no (control negativo) con el péptido Fg1.1.1 a las concentraciones de 1.52, 3.05, 6.1 y 12.2  $\mu$ M o la referencia (inhibidor I de Jak a 10  $\mu$ M; control positivo) y se preincubaron durante 2 o 24 horas. Después de esta preincubación, se retiró el medio y se reemplazó por medio de cultivo que contenía o no Fg1.1.1 a las concentraciones de 1.52, 3.05, 6.1 y 12.2  $\mu$ M o el inhibidor de JAK a la concentración de 10  $\mu$ M y mezcla proinflamatoria (combinación de IL-17 + OSM + TNF- $\alpha$ , cada uno a 3 o 5 ng/ml) y se incubaron las células durante 48 o 72 horas.

#### Ensayo de adhesión

- 20 Se ajustó la suspensión bacteriana a 600 nm hasta la concentración deseada, se pretrató con los péptidos Fg1 y Fg2 a la concentración final de 0.87 a 7  $\mu$ M durante 1 h a 37°C y se depositó sobre las células saturadas previamente con una disolución de PBS SVF al 2% durante 2 h. Después de la incubación durante 1 h a 37°C, se retiraron las bacterias no unidas mediante 3 lavados con PBS y se detectan las bacterias fijadas mediante una disolución de estreptavidina-peroxidasa de 0.5  $\mu$ g/ml durante 30 min. Después de 3 lavados, se revelan las bacterias detectadas mediante el sustrato ABTS (sal de diamonio de 2,2'-azinobis-[ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) durante 30 min y se leen a 410 nm.

#### Medición de la producción de ERO mediante análisis espectrofluorimétrico

- 30 Se sembraron todas las líneas celulares (de 5.10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> células/pocillo) en placas de 96 pocillos (Corning Costar, Brumath, Francia) y se trataron tal como se describió previamente. Después de la estimulación, se lavaron las células tres veces en PBS y se incubaron con 100  $\mu$ l por pocillo de DHE 5  $\mu$ M (para la determinación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o H<sub>2</sub>-DCFDA 5  $\mu$ M (para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 30 min tal como se describió previamente y se registró la intensidad de fluorescencia cada hora durante un periodo de 5 h. Los máximos de excitación/emisión de fluorescencia fueron para DHE: 480/610 nm y para H<sub>2</sub>-DCFDA: 507/525 nm. Al final del experimento, se evaluó el número de células adherentes mediante el ensayo de violeta cristal tal como se describe a continuación. Se sometieron a ensayo O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante espectrofluorimetría en un espectrofluorímetro Fusion (PackardBell, París, Francia). Se calcularon los niveles de ERO en cada muestra de la siguiente manera: tasa de especies reactivas de oxígeno (unidades arbitrarias/min/10<sup>6</sup> células) = (intensidad de fluorescencia [unidades arbitrarias] a T5h - intensidad de fluorescencia [unidades arbitrarias] a T0)/300 minutos/número de células adherentes medidas mediante el ensayo de violeta cristal, y se expresaron como unidad arbitraria (A.U.).

#### Ensayos de viabilidad celular

- 45 Se utilizó tinción con violeta cristal para determinar el número de células adherentes en placas de 96 pocillos. Brevemente, después de la incubación con el compuesto de prueba, se desechó el medio de cultivo y se incubaron las células con una disolución de violeta cristal al 0.05% (Sigma) durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, se añadió metanol al 100% y se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 540 nm en un lector ELISA multipocillo. Se realizó el ensayo de MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazano) para someter a prueba la viabilidad celular en placas de 96 pocillos. Se incubaron las células con una disolución de MTT al 0.2% en medio de cultivo celular durante 4 h a 37°C. Luego, se desechó la disolución de MTT y se añadió DMSO para solubilizar los cristales de MTT-formazano producidos en las células vivas. Después de mezclado meticuloso, se midió la absorbancia a 540 nm.

#### ELISA

- Se midió la concentración de proteína de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12, hBD-2 y TNF- $\alpha$  humanos en los sobrenadantes de células estimuladas utilizando diversos kits ELISA Set (kit Ready-Set-Go de eBioscience para experimentos de acné, y para experimentos de psoriasis, el kit para IL-8 Duo set de R&D Systems y BD-2 Human Development (hBD-2) de Peprotech) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron diluciones en serie de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12 y TNF- $\alpha$  recombinantes humanos para la curva patrón. Se determinó la densidad óptica a 450 nm con una corrección de longitud de onda de 540 nm.

#### Análisis estadístico

- 65 Se analizó la significación estadística de las diferencias entre los datos de los grupos experimentales mediante la

prueba de Student para datos emparejados. Se aceptó como significativo un nivel de  $P \leq 0.05$ . La significación estadística está indicada por \* ( $P \leq 0.05$ ), \*\* ( $P \leq 0.01$ ) y \*\*\* ( $P \leq 0.001$ ), respectivamente.

## Resultados

### Identificación de proteínas de la superficie celular con ligandos eucariotas de *P. acnes*

Para identificar la proteína de superficie de *P. acnes* reconocida por ligandos de ECM, se utilizaron las proteínas de ECM más comunes reconocidas por bacterias relacionadas con la piel como colágenos y fibrinógeno. Se hizo crecer la cepa de *P. acnes* sobre tres medios diferentes para permitir que las bacterias expresaran sus supuestas proteínas de superficie que se extrajeron calentando la suspensión bacteriana en presencia o no de cloruro de litio. Para identificar proteínas de superficie, se separaron electroforéticamente extractos de proteína térmica total de *P. acnes* y se detectaron mediante tinción con plata (figura 1B). Se detectaron varias bandas que oscilaban entre 14 y 100 kDa con una proteína de una masa molecular aparente de 58 kDa que representa aproximadamente > 90% del extracto de proteína total (figura 1B, carril 2). No se encontraron diferencias importantes entre los medios RCM y RCM con Tween 20 al 0.1%, sin embargo parece que se extraen más proteínas en presencia de litio en lugar de la extracción térmica sola. Cuando se hace crecer *P. acnes* sobre medios sólidos enriquecidos con sangre, la proteína de 58 kDa está presente en ambos extractos asimismo con una banda de proteína a aproximadamente 90 kDa y otra a aproximadamente 20 kDa sólo presente en el extracto térmico de litio (figura 1B, carril 3). Se identificó posteriormente la supuesta adhesina de superficie de *P. acnes* mediante inmunotransferencia de tipo Western con ligandos biotinilados (figura 1A). Se halló que la proteína de 58 kDa era reconocida por el fibrinógeno biotinilado (figura 1A, carril 2) tanto en el extracto térmico como en el extracto térmico de litio, independientemente del medio de cultivo utilizado. No se encontró reconocimiento con colágenos (figura 1, carril 2). Se obtuvieron reconocimientos muy débiles y no reproductivos con los colágenos VI y no se consideraron específicos. Es interesante indicar que la intensidad de reconocimiento es mayor en el extracto de litio, lo que sugiere una mejor recuperación con este método. Además, hacer crecer *P. acnes* en diferentes medios no afectó drásticamente a la expresión de las proteínas de superficie reconocidas. Según estos resultados, se hizo crecer *P. acnes* en medio RCM y para extraer térmicamente las proteínas de la superficie en presencia de litio. Para confirmar estos resultados, se inmovilizó la proteína de superficie total de *P. acnes* sobre una placa de poliestireno y se analizó con sonda con Fg biotinilado y colágeno I (figura 2). En primer lugar, se sometieron a prueba varias concentraciones de extracto de proteína y se mostró una actividad de unión para el fibrinógeno que alcanzó una meseta en aproximadamente 6.25 µg/ml de proteína por pocillo, mientras que no se detectó actividad de unión para el colágeno I. Para verificar este resultado, se inmovizaron 25 µg/ml de proteína por pocillo y se sometieron a prueba con diversas cantidades de Fg biotinilado y colágeno I (figura 2B). Se ha demostrado una fuerte actividad de unión con el fibrinógeno, que alcanza una meseta, lo que sugiere una posible saturación de los sitios reconocidos. No se detectó actividad de unión con el colágeno I, lo que indica una interacción específica entre fibrinógeno y el extracto de proteína de *P. acnes*. Estos resultados están de acuerdo con los resultados cualitativos presentados previamente. La proteína de 58 kDa aún no se ha descrito, por lo que se procedió a su caracterización. Debido a que 58 kDa es una proteína de unión a fibrinógeno extraída de la superficie de *P. acnes*, se denominó Pfg.

### Caracterización de Pfg

Se separó el extracto de superficie de *P. acnes* mediante electroforesis en gel 2D. La primera dimensión fue un IEF que cubría un amplio intervalo de pI de 10 a 3. La segunda dimensión se ejecutó en SDS-PAGE al 12.5%, después de lo cual se detectaron las proteínas mediante tinción con plata (figura 3A). Se observaron aproximadamente 50 manchas de proteína después de la separación (figura 3A). Para localizar las manchas correspondientes a Pfg, se hizo correr un segundo gel en paralelo y se sometió al ensayo de inmunotransferencia de ligando de tipo Western utilizando fibrinógeno biotinilado (figura 3B). Pfg apareció bajo 2-3 manchas principales (figura 3B, carril 3) y se hicieron coincidir con las manchas en el gel teñido con plata (figura 3A, carril 3). La presencia de varias manchas, todas reconocidas por el fibrinógeno, sugiere que la Pfg se glicosilará y, por tanto, separará en varios puntos isoelectrónicos durante la primera dimensión. Se cortó la mancha de proteína de interés y se caracterizó mediante MALDI-ToF de mezclas de péptidos después de digestión en gel. La figura 3C muestra un espectro de masas de MALDI de una mezcla de péptidos tripticos producida a partir de la mancha de proteína señalada con una flecha en la figura 3A. Se halló que veintidós masas de péptidos tripticos obtenidas experimentalmente coincidían con las masas de péptidos predichas dentro de 0.1 Da, cubriendo el 57% de la secuencia de aminoácidos. La búsqueda en la base de datos de secuencias de proteínas identificó la proteína como el producto del gen de la proteína hipotética de *P. acnes*, la supuesta proteína de adhesión o de la capa S YP\_056792 (tabla 3) (GeneID 2933198, etiqueta de locus PPA2127) (Bruggemann 2004). El producto del gen PPA2127 es una proteína hipotética de 405 aminoácidos con una región repetitiva rica en prolina-treonina en el extremo C-terminal (proteína repetitiva de prolina-treonina [PTRP]). El análisis de la secuencia de aminoácidos de PTRP mostró la presencia de 16 repeticiones en tándem del motivo Pro-Thr o Pro-Lys en la región C-terminal desde las posiciones 324 a 355. La masa molecular teórica de la proteína es de 41,7 kDa. El análisis de la secuencia de proteína reveló la presencia de un motivo LPXTG en la posición 400 en el extremo C-terminal correspondiente a un posible sitio de motivo de anclaje celular para una sortasa y argumentando a favor de una proteína de superficie presente en la membrana de *P. acnes*.

Tabla 3: masas moleculares medidas y calculadas para péptidos trípticos<sup>a</sup>.

Masa (Da) <sup>b</sup>			Posición	Secuencia
Medido	Calculado	Diferencia		
503.27	503.28	-0.01	249-253	AGIDK (SEQ ID N°: 25)
813.50	813.51	-0.01	65-73	AAIAGALVK (SEQ ID N°: 26)
818.42	818.42	0.00	300-306	TAEQLEK (SEQ ID N°: 27)
837.53	837.53	0.00	242-248	IVTHLVR (SEQ ID N°: 28)
928.55	928.54	0.01	124-133	AAAAVDLGIK (SEQ ID N°: 29)
954.58	954.57	0.01	254-262	SLAVQIAPR (SEQ ID N°: 30)
979.57	979.56	0.01	214-222	AAIEHIIGR (SEQ ID N°: 31)
1069.63	1069.62	0.01	270-279	EPLLALNTAK (SEQ ID N°: 32)
1084.60	1084.58	0.02	287-296	QIVDVITADK (SEQ ID N°: 33)
1101.62	1101.61	0.01	287-296	QIVDVITADK (SEQ ID N°: 34)
1107.67	1107.66	0.01	213-222	KAAIEHIIGR (SEQ ID N°: 35)
1112.62	1112.62	0.00	307-316	ELPALDDLK (SEQ ID N°: 36)
1159.66	1159.65	0.01	95-104	EGVLLINHHK (SEQ ID N°: 37)
1282.75	1282.74	0.01	195-207	AEIAAQAALLVGR (SEQ ID N°: 38)
1332.69	1332.69	0.00	74-87	AGFSSADAVAPR (SEQ ID N°: 39)
1341.73	1341.73	0.00	152-165	DAVVANLVAAGVDK (SEQ ID N°: 40)
1469.84	1469.83	0.01	152-166	DAVVANLVAAGVDKK (SEQ ID N°: 41)
1644.93	1644.90	0.03	74-90	AGFSSADAVAPRIK (SEQ ID N°: 42)
1810.00	1810.02	-0.02	134-151	ATLAATIIPNALHSAAFK (SEQ ID N°: 43)
1834.08	1834.08	0.00	170-189	ATAVAIAATALNPALGPIAK (SEQ ID N°: 44)
1903.02	1903.02	0.00	223-241	SFDAAVATAIVSSPILNAR (SEQ ID N°: 45)
3284.49	3284.54	-0.05	373-405	SGGHSQGGSGTHYIHGVPVLTSSDLPSTGF (SEQ ID N°: 46)

<sup>a</sup>: Estos péptidos que identificaron la proteína de 58 kDa BAND, cubren 231 de 405 residuos, lo que corresponde a una cobertura de secuencia del 57%. <sup>b</sup>: Masas monoisotópicas.

#### Purificación de pfg

En la tabla 4, se resumen los resultados de una purificación típica de Pfg. La precipitación de sal del gran volumen del extracto de litio *P. acnes* dio como resultado la concentración de la proteína y un pequeño aumento de la actividad específica (1,45 veces la actividad de unión a fibrinógeno por unidad de proteína) del extracto concentrado resultante (tabla 4 y figuras 4C, D, carril 3). Se fraccionó la proteína de superficie del concentrado de *P. acnes* en una columna de intercambio aniónico (figura 4A). Se retiró una gran cantidad de contaminante proteico durante esta etapa, partiendo a la concentración de NaCl 180 mM. Se eluyeron las fracciones que contenían la actividad de unión a fibrinógeno a la concentración de NaCl partiendo a 160 mM (figura 4A). Esta fracción contiene una gran proporción de Pfg junto con pocos contaminantes de proteínas débiles (figuras 4C y D, carril 4). Se logró la purificación final de Pfg mediante filtración en gel de alta resolución con Sephacryl durante la cual se retiraron por completo todos los contaminantes proteicos (figuras 4B y C, D, carril 5). La cantidad de Pfg pura obtenida tras esta etapa fue de 0.23 mg, con una actividad específica de 1840 U/mg (tabla 4).

Tabla 4: purificación de Pfg.

Etapas de purificación	Proteína (mg)	Unidades totales (U)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación de Pfg (%)
PAHE	1343	390000	290	/
cPAHE	378	160000	423	100
Intercambio aniónico	2.9	3000	1034	1.87
Filtración en gel	0.2	368	1840	0.23

#### Especificidad de unión a Pfg

Puesto que se demostró que el fibrinógeno reconoce la Pfg, se utilizó este ligando de ECM para analizar la naturaleza de esta interacción. En primer lugar se analizó la capacidad del fibrinógeno para ser reconocido por Pfg purificada (figura 5). Se inmovilizaron Fg humano y bovino (hFg, bFg) en una placa de poliestireno y se midió la actividad de unión de Pfg biotinilada. Se demostró que la unión de Pfg a hFg y bFg depende de la dosis con una mayor afinidad por hFg. Se utilizó albúmina de suero bovino como control negativo que no mostró actividad de unión (figura 5A). Para determinar qué subunidad de Fg es reconocida por Pfg, se separó Fg electroforéticamente y se realizó el ensayo de unión (figuras 5B, C, D). Se ha demostrado que hFg (figura 5D, carril 3) y bFg (figura 5D, carril 4) son reconocidos por Pfg. Además, parece que la subunidad B $\beta$  se reconoce fuertemente tanto en hFg como en bFg, mientras que sólo se reconoce la subunidad A $\alpha$  en hFg. No se observó reconocimiento para la subunidad  $\gamma$  así como para la albúmina de suero utilizada como control (figura 5D, carril 2). Estos resultados están

de acuerdo con los resultados obtenidos con fibrinógeno inmovilizado y demostraron el reconocimiento específico de Pfg para Fg. Se ha demostrado que el fibrinógeno es una glicoproteína que contiene glicanos unidos tanto a N como a O (Debeire 1985; Reid Townsend 1982; L'Hôte 1996). Para demostrar qué parte de la glicoproteína estaba involucrada en el reconocimiento por proteínas de superficie de *P. acnes*, se trató fibrinógeno purificado con PNGasa F y O-glicosidasa para retirar específicamente los glicanos unidos a N y O de la estructura principal de la proteína, respectivamente, y se sometió a prueba su capacidad para reconocerse por extracto de proteína de superficie de *P. acnes* (figuras 6 y 7). Después de retirarse los glicanos ligados a N, el fibrinógeno todavía se reconocía fuertemente por Pfg (figura 6B, carriles 3 y 5). En paralelo, se evaluó la desglicosilación mediante la visualización de un cambio en la movilidad después de la separación por electroforesis y la tinción con azul de Coomassie (figura 6A, carriles 3 y 5) y asimismo mediante la utilización de la lectina vegetal RCA-I capaz de reconocer residuos de galactosilo ligados a  $\beta$  en posición terminal (figura 6C) (Green, 1987). Se demostró que la Fg desglicosilada ya no era reconocida por la lectina RCA-I (figura 6C, carriles 3 y 5). Se obtuvieron los mismos resultados después de retirar los glicanos ligados a O (figura 7B, carril 3) donde los controles de desglicosilación mostraron que el tratamiento enzimático retiró todos los hidratos de carbono tal como detectó el cambio de movilidad (figura 7A, carril 3) y por lectina vegetal de tipo jacalina que está reconociendo específicamente residuos de Gal $\beta$ (1-3) en glicanos unidos a O (Tachibana 2006) (figura 7C, carril 3). Estos resultados indican que la estructura principal de la proteína del fibrinógeno estaba involucrada en el proceso de reconocimiento por proteína de superficie de *P. acnes*.

#### Delineación de la secuencia de fibrinógeno humano B $\beta$ reconocida por Pfg

Se dividió arbitrariamente la subunidad B $\beta$  del fibrinógeno humano en 4 secuencias iguales (Fg1, Fg2, Fg3, Fg4) que se obtuvieron mediante RT-PCR a partir de hepatocitos humanos. Se purificaron los amplicones, que contenían los sitios de restricción para EcoRI y XhoI, y posteriormente se clonaron en el plásmido pBSK para la producción de los insertos de Fgs que se clonaron en el plásmido de expresión pGEX-4F-2 (figura 8A). Se sometieron clones de *E. coli* recombinantes a inducción con IPTG y se analizó la proteína total mediante electroforesis. Se sobreexpresaron proteínas recombinantes de masa molecular aparente de 37 y 43 kDa para Fg1 y Fg2, Fg3, Fg4, respectivamente, después de la inducción (figura 8B). El contacto con Pfg biotinilada ha demostrado que sólo se reconoció Fg1 (figura 8C).

#### El péptido derivado del fibrinógeno inhibe la interacción entre Pfg y fibrinógeno

Puesto que se ha demostrado que sólo Fg1 era capaz de reconocer Pfg, se pretrató Pfg biotinilada con diversas concentraciones de Fg1 purificado y se sometió a prueba su capacidad para reconocer fibrinógeno inmovilizado. Se utilizaron Fg2 y BSA como controles negativos (figura 9). Se ha demostrado que Fg1 disminuyó drásticamente el reconocimiento entre Pfg y fibrinógeno humano, mientras que Fg2 y BSA no lo hicieron.

Estos resultados muestran que la interacción entre Pfg y el fibrinógeno implica la estructura principal de la proteína del fibrinógeno. Así, la utilización de un péptido recombinante de la subunidad B $\beta$  del fibrinógeno humano permite inhibir la interacción entre Pfg y el fibrinógeno.

#### Evaluación del efecto antiadhesivo de Fg1 sobre diferentes cepas de *P. acnes*

Se marcan bacterias *P. acnes* completas mediante biotinilación, se pretratan o no con los péptidos y se ponen en contacto con las diversas líneas celulares. Después de retirar las bacterias no fijadas, se midió espectrofotométricamente la actividad de adhesión utilizando el conjugado estreptavidina-peroxidasa y un sustrato cromogénico. Se sometieron a prueba todos los lotes de productos y péptidos de Fg1, Fg2 en cuanto a citotoxicidad en 5 líneas celulares. Se ha demostrado que Fg1 y Fg2 no presentan actividad citotóxica en ninguna de las líneas celulares (figura 10).

Se sometió a prueba la capacidad de las cepas de *P. acnes* 6919, RON y PIE a 3 concentraciones para adherirse a diversas líneas celulares. Se ha demostrado que las cepas de *P. acnes* sometidas a prueba se unieron a los tres tipos de líneas celulares sometidas a prueba (queratinocitos, monocitos y fibroblastos) hallándose una fuerza de adhesión máxima para los queratinocitos (figura 11). Sabiendo que *P. acnes* es capaz de reconocer el fibrinógeno, se utilizó fibrinógeno completo humano y bovino para competir en la interacción entre las bacterias y la célula diana. Se ha demostrado que una cantidad cada vez mayor de fibrinógeno tanto humano como bovino es capaz de inhibir la adhesión de *P. acnes* a los queratinocitos (figura 12). Luego, se evaluó la capacidad de Fg1 para inhibir la adhesión de bacterias y RON, PIE en los 3 tipos principales de células. Se ha demostrado que el péptido Fg1 inhibe la adhesión de la cepa RON de una manera dependiente de la dosis en queratinocitos (NHDK), monocitos (THP-1) y fibroblastos (HDF). En paralelo, el péptido Fg2, utilizado como control negativo, no muestra actividad antiadhesiva (figura 13). Se obtuvieron los mismos resultados con las cepas de *P. acnes* 6919 y PIE.

Así, se ha demostrado que las cepas de *P. acnes* pueden adherirse a diferentes células diana con una mayor afinidad por queratinocitos. Todo el fibrinógeno puede competir en la adhesión entre las bacterias y los queratinocitos. Cuando se utilizó el péptido recombinante Fg1 de la subunidad B $\beta$  del fibrinógeno, disminuyó

significativamente la adhesión de las bacterias completas a las células diana.

#### Evaluación de la actividad antiinflamatoria de Fg1 en células estimuladas con *P. acnes*

5 Para evaluar la eficacia del péptido recombinante Fg1, se midió la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  por células HaCaT NHDK, THP-1, MRC5 y HDF estimuladas por las cepas de *P. acnes* 6919, RON y PIE pretratadas. Se comparó la cantidad de ERO producida con la producida por las células estimuladas con bacterias no tratadas. Se obtuvo la línea base de producción midiendo ERO en células no estimuladas. Asimismo se midió la producción de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12 y TNF- $\alpha$  en todas las condiciones citadas anteriormente. Se realiza la medición de la producción de ERO  
10 mediante espectrofluorimetría en presencia de fluorocromos específicos directamente en la célula de monocapa. Se realizó en paralelo la medición de la producción de citocinas en el sobrenadante del cultivo celular.

Se implementaron dos conjuntos de experimentos: 1) se estimularon las células (18 h a 37°C) por cepas de *P. acnes* pretratadas previamente con los péptidos Fg1 y Fg2 a concentraciones finales que oscilaron entre 0.87 y 7  $\mu$ M durante 1 h a 37°C; y 2) se pretrataron las células en primer lugar con ñps péptidos Fg1 y Fg2 en las concentraciones finales que oscilaron entre 0.87 a 7  $\mu$ M durante 24 h a 37°C y se estimularon (18 h a 37°C) por cepas de *P. acnes*.

20 Se ha demostrado que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  es importante en todas las líneas celulares sometidas a prueba cuando se estimulan por las tres cepas de *P. acnes*, estos resultados representan experimentos de control. Por el contrario, el pretratamiento de cepas de *P. acnes* por el péptido Fg1 inhibe la producción de  $O_2^{\cdot-}$  de manera dependiente de la dosis en las cinco líneas celulares y las tres cepas sometidas a prueba. Se obtuvo el mismo tipo de resultados para la producción de  $H_2O_2$  en ambos conjuntos de experimentos (tabla 5). La figura 14 corresponde a los resultados obtenidos con la cepa de *P. acnes* PIE en la línea celular de queratinocitos HaCaT y es representativa de los resultados obtenidos con todas las bacterias *P. acnes* y líneas celulares sometidas a prueba.

Se ha demostrado que la producción de IL-1 $\beta$  es eficaz sólo para los monocitos. Fg1 no presenta ningún efecto sobre la producción de IL-1 $\beta$ , cualquiera que sea la cepa de *P. acnes* utilizada (tabla 5). La producción de TNF- $\alpha$  es eficaz para los monocitos y fibroblastos, mientras que es más aleatoria en los queratinocitos. Se mostró un efecto de respuesta a la dosis de Fg1 sobre la disminución de la producción de TNF- $\alpha$  por monocitos y fibroblastos para las 3 cepas bacterianas sometidas a prueba. La producción de IL-12 fue muy baja o inexistente para todas las cepas bacterianas y líneas celulares sometidas a prueba, demostrando ser un mal marcador de la inflamación en este modelo (tabla 5). La producción de IL-8 es importante para los queratinocitos (HaCaT y primarios) y los fibroblastos (MRC5 y primarios) cuando se estimulan por tres cepas de *P. acnes* (6919, RON y PIE). Los monocitos no producen IL-8. Se demostró un efecto de respuesta a la dosis de Fg1 sobre la disminución de la producción de IL-8 en queratinocitos y fibroblastos en las 3 cepas bacterianas sometidas a ensayo. En la figura 15, se muestran resultados representativos y se refieren a la producción de IL-8 obtenida en la línea celular MRC5 con la cepa de *P. acnes* RON.

Tabla 5: resultados globales de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de Fg1

Producción de molécula inflamatoria	Cepa de <i>P. acnes</i>	Conjunto de experimentos	Naturaleza de la prueba	Línea celular				
				Queratinocito		Fibroblasto		Monocito
				HaCaT	NHDK	MRC5	HDF	
Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	6919	I	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
		II	Control	nt	pos.	nt	pos.	pos.
			Inhibición	nt	pos.	nt	pos.	pos.
	RON	I	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
		II	Control	nt	pos.	nt	pos.	pos.
			Inhibición	nt	pos.	nt	pos.	pos.
	PIE	I	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
		II	Control	nt	pos.	nt	pos.	pos.
			Inhibición	nt	pos.	nt	pos.	pos.
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	6919	I	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
		II	Control	nt	pos.	nt	pos.	pos.
			Inhibición	nt	pos.	nt	pos.	pos.
	RON	I	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
		II	Control	nt	pos.	nt	pos.	pos.
			Inhibición	nt	pos.	nt	pos.	pos.
	PIE	I	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.

Producción de molécula inflamatoria	Cepa de <i>P. acnes</i>	Conjunto de experimentos	Naturaleza de la prueba	Línea celular				
				Queratinocito		Fibroblasto		Monocito
				HaCaT	NHDK	MRC5	HDF	ThP1
Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ )	6919	II	Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
			Control	nt	pos.	nt	pos.	pos.
			Inhibición	nt	pos.	nt	pos.	pos.
		I	Control	na	pos.	na	na	pos.
			Inhibición	na	pos.	na	na	NO
			Control	na	na	na	na	pos.
	RON	II	Inhibición	na	na	na	na	NO
			Control	na	na	na	na	pos.
			Inhibición	na	na	na	na	NO
		I	Control	na	na	na	na	pos.
			Inhibición	na	na	na	na	NO
			Control	na	na	na	na	pos.
Interleucina 8 (IL-8)	6919	II	Inhibición	na	na	na	na	NO
			Control	na	na	na	na	pos.
			Inhibición	na	na	na	na	NO
		I	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	na
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	na
			Control	pos.	pos.	pos.	pos.	na
	RON	II	Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	na
			Control	pos.	pos.	pos.	pos.	na
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	na
		I	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	bajo
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	na
			Control	pos.	pos.	pos.	pos.	na
Interleucina TNF alfa (TNF- $\alpha$ )	6919	II	Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	na
			Control	pos.	pos.	pos.	pos.	na
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	na
		I	Control	na	na	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	na	na	pos.	pos.	pos.
			Control	na	na	pos.	pos.	pos.
	RON	II	Inhibición	na	na	pos.	pos.	pos.
			Control	na	na	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	na	na	pos.	pos.	pos.
		I	Control	na	na	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	na	na	pos.	pos.	pos.
			Control	na	na	pos.	pos.	pos.
Interleucina 12 (IL-12)	6919	II	Inhibición	na	na	pos.	pos.	pos.
			Control	na	na	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	na	na	pos.	pos.	pos.
		I	Control	na	na	na	na	bajo
			Inhibición	na	na	na	na	pos.
			Control	na	na	na	na	na
	RON	II	Inhibición	na	na	na	na	na
			Control	na	na	na	na	na
			Inhibición	na	na	na	na	na
		I	Control	na	pos.	na	na	na
			Inhibición	na	pos.	na	na	na
			Control	na	na	na	na	na
Interleucina 12 (IL-12)	6919	II	Inhibición	na	na	na	na	na
			Control	na	na	na	na	na
			Inhibición	na	na	na	na	na
		I	Control	na	na	na	na	na
			Inhibición	na	na	na	na	na
			Control	na	na	na	na	na
	RON	II	Inhibición	na	na	na	na	na
			Control	na	na	na	na	na
			Inhibición	na	na	na	na	na
		I	Control	na	na	na	na	na
			Inhibición	na	na	na	na	na
			Control	na	na	na	na	na

na: no aplicable; nt: no sometido a prueba

Control pos.: la producción de moléculas inflamatorias en célula no estimulada y estimulada por *P. acnes* es negativa y positiva, respectivamente.

Control bajo: la producción de moléculas inflamatorias en célula no estimulada y estimulada por *P. acnes* es negativa y débil, respectivamente.

Inhibición pos.: Fg1 disminuye la producción de molécula inflamatoria de manera dependiente de la dosis

Inhibición N°: Fg1 no presenta efecto sobre la producción de molécula inflamatoria.

I: Conjunto de experimentos en el que en primer lugar se pretratan las bacterias. II: conjunto de experimentos en el que en primer lugar se pretratan las células

### Evaluación de la actividad antiinflamatoria de péptidos pequeños generados a partir de Fg1

Se dividió la secuencia de aminoácidos de Fg1 que contenía 106 residuos en 3 secuencias pequeñas no solapantes que contenían entre 30 y 36 residuos de aminoácido (péptidos pequeños relacionados con Fg1; Fg1.1, Fg1.2 y Fg1.3). Para evitar la pérdida de supuesta actividad en las áreas de corte, se generaron dos secuencias solapantes con las 2 áreas de corte a partir de este sitio de corte (Fg1.4 y Fg1.5) (figura 16).

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad de todos los péptidos pequeños relacionados con Fg1 y se demostró que todos los péptidos pequeños sometidos a prueba no eran tóxicos para las células en el intervalo de 2.5 a 20  $\mu$ M. La figura 1 muestra los resultados obtenidos en la línea celular HaCaT de queratinocitos inmortalizados. Se obtuvieron los mismos resultados en las líneas celulares de monocitos ThP1 y fibroblastos MRC5 inmortalizados.

Para evaluar la eficacia del péptido pequeño relacionado con Fg1, se midió la producción de  $H_2O_2$  por varias líneas celulares (HaCaT, NHDK, THP-1, MRC5 y HDF) estimuladas por tres cepas de *P. acnes* 6919, RON y PIE, en presencia o no con los péptidos pequeños. La cantidad de  $H_2O_2$  producida se compara con la producida por las células estimuladas con bacterias no tratadas. Se obtiene la línea base de producción midiendo  $H_2O_2$  en células no estimuladas. Se realiza la medición de la producción de  $H_2O_2$  mediante espectrofluorimetría en presencia de fluorocromos específicos directamente en la célula de monocapa.

Se han implementado dos conjuntos de experimentos:

I) se estimulan las células (18 h a 37°C) por cepas de *P. acnes* pretratadas previamente con los péptidos pequeños Fg1.1, Fg1.2, Fg1.3, Fg1.4 y Fg1.5 a las concentraciones finales que oscilaron entre 2.5 y 20  $\mu$ M durante 1 h a 37°C;

II) en primer lugar se pretratan las células con los cinco péptidos pequeños en las concentraciones finales que oscilaron entre 2.5 y 20  $\mu$ M durante 24 h a 37°C y se estimulan (18 h a 37°C) por cepas de *P. acnes*.

Se ha demostrado que la producción de  $H_2O_2$  es adecuada en todas las líneas celulares sometidas a prueba cuando se estimulan por las tres cepas de *P. acnes*, estos resultados representan experimentos de control. Por el contrario, el pretratamiento de cepas de *P. acnes* por los péptidos pequeños Fg1.1 y Fg1.4 inhibe la producción de  $H_2O_2$  de manera dependiente de la dosis en las cinco líneas celulares y las tres cepas sometidas a prueba, mientras que los péptidos pequeños Fg1.2, Fg1.3 y Fg1.5 no lo hicieron. La figura 17 corresponde a los resultados obtenidos con la cepa de *P. acnes* RON en la línea celular de fibroblastos MRC5 y son representativos de los resultados obtenidos con todas las bacterias *P. acnes* y líneas celulares sometidas a prueba (tabla 6).

Tabla 6: resultados globales de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de péptidos pequeños generados a partir de Fg1.

Producción de molécula inflamatoria	Cepa de <i>P. acnes</i>	Conjunto de experimentos	Naturaleza de la prueba	Línea celular				
				Queratinocito		Fibroblasto		Monocito
				HaCaT	NHDK	MRC5	HDF	ThP1
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	6919	I	Control	pos.	nt	pos.	nt	pos.
			Inhibición	pos.	nt	pos.	nt	pos.
		II	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
	RON	I	Control	pos.	nt	pos.	nt	pos.
			Inhibición	pos.	nt	pos.	nt	pos.
		II	Control	nt	pos.	nt	pos.	pos.
			Inhibición	nt	pos.	nt	pos.	pos.
	PIE	I	Control	pos.	nt	pos.	nt	pos.
			Inhibición	pos.	nt	pos.	nt	pos.
		II	Control	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
			Inhibición	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.

nt: no sometido a prueba

Control pos.: la producción de  $H_2O_2$  en célula no estimulada y estimulada por *P. acnes* es negativa y positiva, respectivamente.

Inhibición pos.: Fg1.1 y Fg1.4 disminuyen la producción de  $H_2O_2$  de manera dependiente de la dosis

I: Conjunto de experimentos en el que en primer lugar se pretratan las bacterias. II: conjunto de experimentos en el que en primer lugar se pretratan las células

### Propiedades antiinflamatorias del fragmento Fg1 en ausencia de *P. acnes*

Para evaluar de manera más general las propiedades antiinflamatorias de los fragmentos Fg1 y Fg2, se midió la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por varias líneas celulares (NHDK, THP-1 y HDF) estimuladas por LTA (ácido lipoteicoico, LPS (lipopolisacárido) y PGN (peptidoglicano), en presencia o no de Fg1 o Fg2.

Los resultados obtenidos para las células NHDK estimuladas por LTA se presentan en la figura 18 y muestran que Fg1, pero no Fg2, disminuye significativamente la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por células NHDK estimuladas por LTA. Se obtuvieron resultados similares en células de fibroblasto primario (HDF) y monocitos (ThP1) estimuladas con LTA, LPS y PGN.

Asimismo se midió la producción de IL-8 en células NHDK estimuladas por LTA, LPS y PGN, en presencia o no de Fg1 o Fg2. Los resultados obtenidos para las células NHDK estimuladas por PGN se presentan en la figura 19 y muestran que Fg1, pero no Fg2, reduce significativamente la producción de IL-8 por las células NHDK estimuladas por PGN. Se obtuvieron resultados similares en células NHDK estimuladas por LTA y LPS.

Estos resultados ilustran que Fg1 asimismo presenta propiedades antiinflamatorias sobre los queratinocitos, independientemente de la presencia de *P. acnes*.

### Evaluación de la actividad antiinflamatoria de péptidos pequeños generados a partir de Fg1.1

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los fragmentos pequeños Fg1.1.1, Fg1.1.2, Fg1.1.3, Fg1.1.4 y Fg1.1.6.

Los inventores evaluaron en primer lugar la citotoxicidad de todos los péptidos pequeños generados a partir de Fg1.1 y demostraron que todos los péptidos sometidos a prueba no eran tóxicos para las células en el intervalo de 2,5 a 20 µM. La figura 20 muestra los resultados obtenidos en la línea celular HaCaT de queratinocitos inmortalizados. Se obtuvieron resultados similares en la línea celular MRC5 de fibroblastos inmortalizados.

La figura 21 muestra el mismo experimento realizado utilizando el diluyente utilizado para disolver los péptidos (vehículo) a las mismas concentraciones. Se prepararon disoluciones madre en: PBS para Fg1.1.4, DMSO al 60%/PBS para Fg1.1.1 y Fg1.1.3, DMSO al 100% para Fg1.1.2.

Estos resultados muestran claramente que los fragmentos pequeños de la invención que presentan secuencias de hasta 20 aminoácidos, preferentemente de hasta 15 aminoácidos, no presentan ningún efecto tóxico sobre los queratinocitos.

Luego, los inventores evaluaron la capacidad de los fragmentos pequeños Fg1.1.1, Fg1.1.2, Fg1.1.3, Fg1.1.4 y Fg1.1.6 para reducir la respuesta inflamatoria de las células después de la estimulación por *P. acnes*. Se midió la producción de IL-8 por líneas celulares (HaCaT y MRC5) estimuladas por la cepa de *P. acnes* 6919. Se comparó la cantidad de IL-8 con la producida por las células estimuladas con bacterias no tratadas. se obtuvo la línea base de producción midiendo IL-8 en células no estimuladas. Se realizó la medición de la producción de IL-8 mediante un ensayo ELISA. Se realizaron dos conjuntos de experimentos que consisten en I) se pretrata en primer lugar la cepa de *P. acnes* con los péptidos a concentraciones finales que oscilaron entre 2.5 y 20 µM (véase la figura 22) y; II) en primer lugar se pretratan las células por los péptidos tal como se describió anteriormente y luego se estimulan por *P. acnes* (véase la figura 23). En este caso, cuanto menor es el nivel de secreción de IL-8, mayor es la capacidad antiinflamatoria del fragmento sometido a prueba.

Los resultados muestran que la producción de IL-8 es adecuada en todas las líneas celulares cuando se estimulan por *P. acnes*. Sin embargo, cuando se pretrata la cepa de *P. acnes* con el péptido Fg1.1.1, disminuye la producción de IL-8 de manera dependiente de la dosis. Aunque se observa cierta inhibición de la producción de IL-8 con otros fragmentos pequeños, el efecto es menos pronunciado que con Fg1.1.1. La figura 22 corresponde a los resultados obtenidos con bacterias pretratadas en células HaCaT. Se han obtenido resultados similares en células de fibroblastos MRC5, así como cuando se pretrataron en primer lugar las líneas celulares (figura 23).

### Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria del péptido pequeño Fg1.1.1

Según resultados previos que muestran eficacia *in vitro* del péptido Fg1.1.1 sobre la respuesta antiinflamatoria, los inventores sometieron a prueba su capacidad para inhibir la reacción inflamatoria inducida por *P. acnes* en un modelo de inflamación *in vivo*.

Este modelo se basa en la capacidad de las orejas del ratón para reaccionar mientras se inyecta *P. acnes* por vía intradérmica. Se evaluó la reacción inflamatoria cada día durante un periodo de 4 días después de la inyección de *P. acnes* midiendo el grosor de las orejas, el enrojecimiento así como la presencia de descamación y/o pequeñas pústulas. Al final del experimento, se realizó la medición final de la inflamación y se tomaron fotografías de las orejas. Luego, se sacrificaron los ratones y se extirparon las orejas así como los ganglios óticos. Se fijaron las

orejas inmediatamente en un tampón que contenía formalina para un análisis histológico futuro. Se pusieron los ganglios óticos en medios de cultivo celular apropiados sobre hielo y se procesaron inmediatamente para extraer linfocitos. Se hizo un recuento de todas las suspensiones de linfocitos y se ajustaron para obtener  $2 \cdot 10^5$  células por pocillo en una placa de 96 pocillos recubierta de antemano con anticuerpos anti-CD3 (2  $\mu\text{g/ml}$ ) y anti-CD28 (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ). Después de 72 h de crecimiento, se midió la tasa de proliferación basándose en un indicador redox relacionado con el metabolismo celular (UptiBlue).

El diseño experimental consistió en 5 grupos que contenían 8 ratones cada uno. 1) PBS corresponde al grupo no tratado al que se le inyectó PBS. 2) PA + vehículo tópico corresponde a *P. acnes* inyectada en orejas tratadas con vaselina sola. 3) PA + péptido tópico corresponde a *P. acnes* inyectada en orejas tratadas con el péptido Fg1.1.1 al 5% mezclado con vaselina. 4) se pretrató la cepa de *P. acnes* ( $\text{DO}_{620\text{ nm}} = 1,5$ ) durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  con el péptido Fg1.1.1 (140  $\mu\text{M}$ ) (grupo PA + péptido inyectado) o 5) con el vehículo sólo (1% de DMSO final en PBS) (grupo de PA + vehículo inyectado) y luego se inyectó por vía intradérmica en orejas de ratones (aproximadamente  $2 \cdot 10^7$  UFC/20  $\mu\text{l}$ ) para inducir la inflamación.

La preparación del gel de péptido Fg1.1.1 al 5% consistió en mezclar extemporáneamente de manera suave 15 mg de péptido con 300 mg de vaselina durante 1 min a temperatura ambiente ( $21^\circ\text{C}$ ) y luego se aplicó directamente a las orejas de ratón.

Los resultados muestran que el péptido Fg1.1.1 es capaz de disminuir la inflamación de la oreja en la aplicación tópica (figura 24, figura 26 #6), así como en bacterias pretratadas (figura 25, figura 26 #5) en comparación con las orejas no tratadas. El análisis histológico reveló un menor número de células inmunitarias infiltradas cuando se aplicó el Fg1.1.1 (figura 27 #5 y 6), así como un nivel reducido de activación de linfocitos (figura 28).

Se compararon las capacidades del fragmento grande Fg1 (106 aminoácidos) y el fragmento pequeño Fg1.1.1 (15 aminoácidos) para inhibir la secreción de IL-8 y se representaron en la figura 29, que muestra el porcentaje normalizado de inhibición de la producción de IL-8 a partir de líneas celulares de queratinocitos inmortalizados. (HaCaT), fibroblastos (MRC5), monocitos (ThP1) y se hicieron crecer líneas celulares de queratinocitos primarios (NHDK), fibroblastos (HDF) a  $37^\circ\text{C}$  bajo en 5% de  $\text{CO}_2$  en DMEM con SVF al 10%, RPMI con SVF al 10%, KGM-Gold, medio FGM, respectivamente; y se sembraron a de  $5 \cdot 10^4$  a  $10^5$  células/pocillo en presencia de concentraciones variables de los péptidos Fg1 o Fg1.1.1.

En este caso, cuanto mayor es la inhibición, mayor es la capacidad antiinflamatoria del fragmento sometido a prueba. La figura 29 muestra asimismo que el porcentaje de inhibición de la producción de IL-8 es mayor cuando se tratan las células con el fragmento pequeño Fg1.1.1 que presenta 15 aminoácidos que con el fragmento grande Fg1 que presenta 211 aminoácidos.

#### Propiedades antiinflamatorias de Fg1.1.1 en un modelo de psoriasis

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica mediada por la infiltración de linfocitos Th17 que inician respuestas fisiopatológicas de los queratinocitos epidérmicos. En este contexto, los queratinocitos son dianas de numerosas citocinas que contribuyen a la regulación de sus propiedades biológicas al contribuir a la respuesta inflamatoria. Esta respuesta de los queratinocitos se caracteriza por una variación en sus capacidades de diferenciación y migración así como por la secreción de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos, entre ellos IL-8, hBD-2, S100A7, IL-12RA2 son buenos marcadores.

Se sembraron células HaCaT de queratinocitos inmortalizados en placas de 96 pocillos a  $10^5$  células/pocillo (Corning Costar, Brumath, Francia) y se estimularon con la cepa de *P. acnes* 6919 ( $\text{D.O.}_{620\text{ nm}} = 0.3$ ) pretratada 1 h a  $37^\circ\text{C}$  con los péptidos Fg1 y Fg1.1.1 a las concentraciones de 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$  durante 18 h a  $37^\circ\text{C}$  bajo el 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego, se retiró el sobrenadante del cultivo y se midió la concentración de IL-8 mediante un ensayo ELISA (eBioscience).

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de Fg1.1.1 en la psoriasis, se utilizó un modelo *in vitro* de queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) estimulados por una mezcla proinflamatoria que reproduce un fenotipo de tipo "psoriasis" (combinación de IL-17 + OSM + TNF- $\alpha$ ). Por tanto, se evaluó la capacidad de Fg1.1.1 para inhibir la liberación de IL-8 y de la proteína  $\beta$ -defensina-2 (hBD-2) por queratinocitos estimulados en estas condiciones.

#### Actividad de Fg1.1.1 sobre la producción de IL-8 (figura 30):

La figura 30 muestra que en condiciones basales, los queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) liberaron una pequeña cantidad de IL-8 (célula sola). Esta liberación aumentó en gran medida con el tratamiento con la combinación de 3 citocinas (células estimuladas). El inhibidor I de Jak de referencia (control positivo) inhibió fuertemente el efecto estimulante de esta asociación (inhibición del 67%).

En las condiciones experimentales de este estudio, Fg1.1.1, sometido a prueba a 6.1 y 12.2  $\mu\text{M}$ , inhibió significativamente la liberación de IL-8 por NHEK con un efecto dependiente de la concentración (inhibición del

25% y el 49%). A menores concentraciones (1,25 y 3.05  $\mu$ M), se observó un efecto menor.

Actividad de Fg1.1.1 sobre la producción de hBD-2 (figura 31):

La figura 31 muestra que en condiciones basales, los queratinocitos epidérmicos humanos normales liberaron una cantidad muy pequeña de proteína  $\beta$ -defensina-2 (hBD-2) (célula sola). Esta liberación aumentó en gran medida con el tratamiento con la combinación de IL-17, TNF- $\alpha$  y OSM (células estimuladas). El inhibidor I de Jak de referencia (control positivo) inhibió fuertemente el efecto estimulante de esta asociación (inhibición del 80%).

En las condiciones experimentales de este estudio, Fg1.1.1 sometido a prueba a 12.2  $\mu$ M inhibió significativamente la liberación de hBD-2 por NHEK. Además, Fg1.1.1 no presentó ningún efecto sobre la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones sometidas a prueba.

Al utilizar un modelo *in vitro* de psoriasis, se ha demostrado que el péptido Fg1.1.1 fue capaz de inhibir la producción de moléculas de IL-8 y hBD-2 de manera dependiente de la dosis sin ninguna citotoxicidad. Además, la inhibición de la producción de quimiocinas IL-8 fue más fuerte que la producción de péptido antimicrobiano hBD-2 en el intervalo de concentraciones sometidas a prueba, lo que sugiere que una dosis mayor suprimiría la producción de ambas moléculas antiinflamatorias. Por tanto, el péptido Fg1.1.1 es un buen candidato para reducir la inflamación similar a la psoriasis.

**Bibliografía**

Brüggemann, H., A. Henne, F. Hoster, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Strittmatter, S. Hujer, P. Dürre, G. Gottschalk. 2004. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*. 305:671-673.

Debeire, P., J. Montreuil, E. Moczar, H. Van Halbeek, J. F. G. Vliegthart. 1985. Primary structure of two major glycans of bovine fibrinogen. *Eur. J. Biochem*. 151:607-611.

Dawson, A., Dellavalle R., 2013, Acne vulgaris, *BMJ*; 346:f2634.

Graham G. M., M. D. Farrar, J. E. Cruse-Sawyer, K. T. Holland, E. Ingham. 2004. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* GroEL. *Br. J. Dermatol*. 150:421-428.

Grange, P. A., C. Chéreau, J. Raingeaud, C. Nicco, B. Weill, N. Dupin, F. Batteux. 2009a. Production of superoxide anions by keratinocytes initiates *P. acnes*-induced inflammation of the skin. *PLoS Pathog*. 5(7): e1000527. doi:10.1371/journal.ppat.1000527.

Grange, P. A., J. Raingeaud, V. Calvez, N. Dupin. 2009b. Nicotinamide inhibits *Propionibacterium acnes*-induced IL-8 production in keratinocytes through the NF-kappaB and MAPK pathways. *J Dermatol. Sci*. 56:106-112.

Green, E. D., R. M. Brodbeck, J. U. Baenziger. 1987. Lectin affinity high-performance liquid chromatography. Interactions of N-glycanase-released oligosaccharides with *Ricinus communis* agglutinin I and *Ricinus communis* agglutinin II. *J. Biol. Chem*. 262:12030-12039.

Grice, E. A., H. H. Kong, S. Conlan, C. B. Deming, J. Davis, A. C. Young, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, P. R. Murray, E. D. Green, M. L. Turner, J. A. Segre. 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324:1190-1192.

Gristina, A. G., P. Naylor, Q. Myrvik. 1988. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med. Prog. Technol*. 14:205-224.

Kang, S., S. Cho, J. H. Chung, C. Hammerberg, G. J. Fisher, J. J. Voorhees. 2005. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-B and activator protein-1 in inflammatory acne lesions *in vivo*. *Am. J. Pathol*. 166:1691-1699.

Kistowska, M., S. Gehrke, D. Jankovic, K. Kerl, A. Fettelschoss, L. Feldmeyer, G. Fenini, A. Kolios, A. Navarini, R. Ganceviciene, J. Schaubert, E. Contassot, L. E. French. 2014 IL-1 $\alpha$  drives inflammatory responses to *Propionibacterium acnes* *in vitro* and *in vivo*. *J. Invest. Dermatol*. 134:677-685.

L'Hôte, C., S. Berger, Y. Karamanos. 1996. O-glycosylation of fibrinogen from different mammalian species as revealed by the binding of *Escherichia coli* biotinylated lectins. *Thromb. Haemost*. 76:710-714.

Nagy, I., A. Pivarsci, A. Koreck, M. Széll, E. Urban, and L. Kemény. 2005. Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human  $\beta$ -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through Toll-like

receptors. J. Invest. Dermatol. 124:931-938.

Patti, J. M., M. Höök. 1994. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. Curr. Opin. Cell. Biol. 6:752-758.

Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. Methods Enzymol. 91:95-119.

Qin, M., A. Pirouz, Kim M.-H, S. R. Krutzik, H. J. Garban, J. Kim. 2014 *Propionibacterium acnes* induces IL-1 secretion via the NLRP3 inflammasome in human monocytes. J. Invest. Dermatol. 134:381-388.

Romero-Steiner, S., T. Witek, E. Balish. 1990. Adherence of skin bacteria to human epithelial cells. J. Clin. Microbiol. 28:27-31.

Shen, W., A. Ljungh. 1993. Collagen binding to *Escherichia coli* strain NG7C. Curr. Microbiol. 27:311-316.

Tachibana, K., S. Nakamura, H. Wang, H. Iwasaki, K. Tachibana, K. Maebara, L. Cheng, J. Hirabayashi, and H. Narimastu. 2006. Elucidation of binding specificity of jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. Glycobiology 16:46-53.

Trivedi, N. R., K. L. Gilliland, W. Zhao, W. Liu, D. M. Thiboutot. 2006. Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling. J. Invest. Dermatol. 126:1071-1079.

Townsend, R. R., R., E. Hilliker, Y.-T. Li, R. A. Laine, W. R. Bell, Y. C. Lee. 1982. Carbohydrate structure of human fibrinogen. Use of 300-MHz <sup>1</sup>H-NMR to characterize glycosidase-treated glycopeptides. J. Biol. Chem 257:9704-9710.

Yu, J.-L., R. Mansson, J.-I. Flock, A. Ljungh. 1997 Fibronectin binding by *Propionibacterium acnes*. FEMS Immun. Med. Microbiol. 19:247-253.

Vorm, O., M. Mann. 1994. Improved mass accuracy in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides. J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 5:955-958.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITE PARIS DESCARTES  
 ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS  
 5 UNIVERSITE PARIS-SUD  
 UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)  
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)  
 INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY  
 10  
 <120> Péptidos aislados y fragmentos de los mismos a partir de fibrinógeno para la utilización como fármacos,  
 particularmente en las enfermedades inflamatorias de la piel  
 <130> B370068D34732  
 15  
 <150> EP 15305414.3  
 <151> 2015-03-20  
 <160> 47  
 20  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 491  
 25 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <223> sub-unit Bbeta of fibrinógeno  
 <400> 1  
 Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys  
 1 5 10 15  
 His Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly  
 20 25 30  
 Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro  
 35 40 45  
 Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro  
 50 55 60  
 Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu  
 85 90 95  
 His Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys Pro Thr Gly Cys Gln Leu  
 100 105 110

# ES 2 880 795 T3

Gln Glu Ala Leu Leu Gln Gln Glu Arg Pro Ile Arg Asn Ser Val Asp  
 115 120 125

Glu Leu Asn Asn Asn Val Glu Ala Val Ser Gln Thr Ser Ser Ser Ser  
 130 135 140

Phe Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu Trp Gln Lys Arg Gln Lys  
 145 150 155 160

Gln Val Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Asn Glu Tyr Ser Ser Glu Leu  
 165 170 175

Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr Val Asn Ser Asn Ile Pro  
 180 185 190

Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu Glu Asn Leu Arg Ser Lys  
 195 200 205

Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr Cys Arg  
 210 215 220

Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu  
 225 230 235 240

Cys Glu Glu Ile Ile Arg Lys Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu  
 245 250 255

Ile Gln Pro Asp Ser Ser Val Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met  
 260 265 270

Asn Thr Glu Asn Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln Asp Gly  
 275 280 285

Ser Val Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly Phe Gly  
 290 295 300

Asn Val Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly Leu Pro Gly  
 305 310 315 320

Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg Met Gly  
 325 330 335

Pro Thr Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val  
 340 345 350

Lys Ala His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr  
 355 360 365

# ES 2 880 795 T3

Gln Ile Ser Val Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Met  
370 375 380

Asp Gly Ala Ser Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His  
385 390 395 400

Asn Gly Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp Leu  
405 410 415

Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp  
420 425 430

Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr Tyr Trp  
435 440 445

Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp Asp Gly  
450 455 460

Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser Met Arg Lys Met  
465 470 475 480

Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln Gln  
485 490

<210> 2  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> fragmento Fg1.1

<400> 2  
Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys  
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly  
20 25 30

Val Asn Asp  
35

<210> 3  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> fragmento Fg1.2

<400> 3  
Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro Leu Asp Lys  
1 5 10 15

Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser  
20 25 30

Gly Gly Gly  
35

<210> 4  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento Fg1.3  
  
 10 <400> 4  
 Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala Thr Gln Lys Lys Val Glu  
 1 5 10 15  
  
 Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu His Ala Asp Pro Asp Leu  
 20 25 30  
  
 Gly Val Leu Cys  
 35  
  
 <210> 5  
 <211> 30  
 15 <212> **PRT**  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento Fg1.4  
  
 20 <400> 5  
 Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly Val Asn Asp Asn  
 1 5 10 15  
  
 Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro Leu Asp  
 20 25 30  
  
 <210> 6  
 25 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 30 <223> fragmento Fg1.5  
  
 <400> 6  
 Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr  
 1 5 10 15  
  
 Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala Thr Gln Lys Lys Val  
 20 25 30  
  
 35 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 40 <220>  
 <223> fragmento Fg1.1.1  
  
 <400> 7  
 Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly Val Asn Asp  
 1 5 10 15  
  
 45 <210> 8  
 <211> 5

<212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 5 <223> fragmento Fg1.1.2  
  
 <400> 8  
 Leu Leu Leu Cys Val  
 1 5  
  
 10 <210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 15 <220>  
 <223> fragmento Fg1.1.3  
  
 <400> 9  
 Phe Leu Val Lys Ser  
 1 5  
  
 20 <210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 25 <220>  
 <223> fragmento Fg1.1.4  
  
 <400> 10  
 Gln Gly Val Asn Asp  
 30 1 5  
  
 <210> 11  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 35 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento Fg1.1.5  
  
 40 <400> 11  
 Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val  
 1 5  
  
 <210> 12  
 <211> 7  
 45 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento Fg1.1.6  
  
 50 <400> 12  
 Lys Ser Gln Gly Val Asn Asp  
 1 5  
  
 <210> 13  
 55 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 60 <223> fragmento Fg1

# ES 2 880 795 T3

<400> 13

Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys  
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly  
20 25 30

Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro  
35 40 45

Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro  
50 55 60

Pro Ile Ser Gly Gly Gly Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala Thr  
65 70 75 80

Gln Lys Lys Val Glu Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu His  
85 90 95

Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys Met Lys Arg Met Val Ser Trp  
100 105 110

Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys His Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
115 120 125

Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly  
130 135 140

Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu  
145 150 155 160

Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr  
165 170 175

Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg  
180 185 190

Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu His Ala Asp Pro Asp Leu Gly  
195 200 205

Val Leu Cys  
210

5

<210> 14

<211> 147

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> fragmento Fg2

# ES 2 880 795 T3

<400> 14

Asp Ala Gly Gly Cys Leu His Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys  
1 5 10 15

Pro Thr Gly Cys Gln Leu Gln Glu Ala Leu Leu Gln Gln Glu Arg Pro  
20 25 30

Ile Arg Asn Ser Val Asp Glu Leu Asn Asn Asn Val Glu Ala Val Ser  
35 40 45

Gln Thr Ser Ser Ser Ser Phe Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Lys Asp Leu  
50 55 60

Trp Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Lys Asp Asn Glu Asn Val Val Asn  
65 70 75 80

Glu Tyr Ser Ser Glu Leu Glu Lys His Gln Leu Tyr Ile Asp Glu Thr  
85 90 95

Val Asn Ser Asn Ile Pro Thr Asn Leu Arg Val Leu Arg Ser Ile Leu  
100 105 110

Glu Asn Leu Arg Ser Lys Ile Gln Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala  
115 120 125

Gln Met Glu Tyr Cys Arg Thr Pro Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro  
130 135 140

Val Val Ser  
145

5

<210> 15

<211> 154

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> fragmento Fg3

# ES 2 880 795 T3

<400> 15

Lys Leu Glu Ser Asp Val Ser Ala Gln Met Glu Tyr Cys Arg Thr Pro  
1 5 10 15

Cys Thr Val Ser Cys Asn Ile Pro Val Val Ser Gly Lys Glu Cys Glu  
20 25 30

Glu Ile Ile Arg Lys Gly Gly Glu Thr Ser Glu Met Tyr Leu Ile Gln  
35 40 45

Pro Asp Ser Ser Val Lys Pro Tyr Arg Val Tyr Cys Asp Met Asn Thr  
50 55 60

Glu Asn Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Asn Arg Gln Asp Gly Ser Val  
65 70 75 80

Asp Phe Gly Arg Lys Trp Asp Pro Tyr Lys Gln Gly Phe Gly Asn Val  
85 90 95

Ala Thr Asn Thr Asp Gly Lys Asn Tyr Cys Gly Leu Pro Gly Glu Tyr  
100 105 110

Trp Leu Gly Asn Asp Lys Ile Ser Gln Leu Thr Arg Met Gly Pro Thr  
115 120 125

Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val Lys Ala  
130 135 140

His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu  
145 150

5

<210> 16

<211> 154

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> fragmento Fg4

# ES 2 880 795 T3

<400> 16

Pro Thr Glu Leu Leu Ile Glu Met Glu Asp Trp Lys Gly Asp Lys Val  
1 5 10 15

Lys Ala His Tyr Gly Gly Phe Thr Val Gln Asn Glu Ala Asn Lys Tyr  
20 25 30

Gln Ile Ser Val Asn Lys Tyr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Ala Leu Met  
35 40 45

Asp Gly Ala Ser Gln Leu Met Gly Glu Asn Arg Thr Met Thr Ile His  
50 55 60

Asn Gly Met Phe Phe Ser Thr Tyr Asp Arg Asp Asn Asp Gly Trp Leu  
65 70 75 80

Thr Ser Asp Pro Arg Lys Gln Cys Ser Lys Glu Asp Gly Gly Gly Trp  
85 90 95

Trp Tyr Asn Arg Cys His Ala Ala Asn Pro Asn Gly Arg Tyr Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gly Gln Tyr Thr Trp Asp Met Ala Lys His Gly Thr Asp Asp Gly  
115 120 125

Val Val Trp Met Asn Trp Lys Gly Ser Trp Tyr Ser Met Arg Lys Met  
130 135 140

Ser Met Lys Ile Arg Pro Phe Phe Pro Gln  
145 150

<210> 17

5 <211> 33

<212> ADN

<213> artificial

<220>

10 <223> cebador

<400> 17

gcaggaattc tgatgaaaag gatggttct tgg 33

<210> 18

15 <211> 33

<212> ADN

<213> artificial

<220>

20 <223> cebador

<400> 18

ggccgctcga gtacacaaca cccccaggtc tgg 33

25

<210> 19

<211> 33

<212> ADN

<213> artificial

30

<220>

<223> cebador

<400> 19  
 gcaggaattc tggatgctgg aggctgtctt cac 33  
 5 <210> 20  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 20  
 ggccgctcga ctagacacca caggaatatt gca 33  
 15 <210> 21  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 21  
 25 gcaggaattc tgaagttaga atctgatgtc tca 33  
 <210> 22  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 30 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 35 <400> 22  
 ggccgctcga gtttcattct gtacagtga tcc 33  
 <210> 23  
 <211> 33  
 40 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 45 <400> 23  
 gcaggaattc tgccacaga acttttgata gaa 33  
 <210> 24  
 <211> 33  
 50 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 55 <223> cebador  
 <400> 24  
 ggccgctcga gtctgtgga agaaggcct gat 33  
 60 <210> 25  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 65 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

<400> 25  
 Ala Gly Ile Asp Lys  
 1 5

5 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

<400> 26  
 Ala Ala Ile Ala Gly Ala Leu Val Lys  
 1 5

15 <210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

<400> 27  
 Thr Ala Glu Gln Leu Glu Lys  
 25 1 5

<210> 28  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 30 <213> artificial

<220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

35 <400> 28  
 Ile Val Thr His Leu Val Arg  
 1 5

<210> 29  
 <211> 10  
 40 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

45 <400> 29  
 Ala Ala Ala Ala Val Asp Leu Gly Ile Lys  
 1 5 10

50 <210> 30  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 55 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

<400> 30  
 Ser Leu Ala Val Gln Ile Ala Pro Arg  
 1 5

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 5  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg  
 <400> 31  
 Ala Ala Ile Glu His Ile Ile Gly Arg  
 10 1 5  
 <210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 15 <213> artificial  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg  
 20 <400> 32  
 Glu Pro Leu Leu Ala Leu Asn Thr Ala Lys  
 1 5 10  
 <210> 33  
 <211> 10  
 25 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg  
 30 <400> 33  
 Gln Ile Val Asp Val Ile Thr Ala Asp Lys  
 1 5 10  
 <210> 34  
 35 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 40 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg  
 <400> 34  
 Gln Ile Val Asp Val Ile Thr Ala Asp Lys  
 1 5 10  
 45 <210> 35  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 50 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg  
 <400> 35  
 Lys Ala Ala Ile Glu His Ile Ile Gly Arg  
 55 1 5 10  
 <210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 60 <213> artificial

<220>  
<223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

<400> 36  
Glu Leu Pro Ala Leu Asp Asp Leu Val Lys  
5 1 5 10

<210> 37  
<211> 10  
<212> PRT  
10 <213> artificial

<220>  
<223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

15 <400> 37  
Glu Gly Val Leu Leu Ile Asn His His Lys  
1 5 10

<210> 38  
<211> 13  
20 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

25 <400> 38  
Ala Glu Ile Ala Ala Gln Ala Ala Leu Leu Val Gly Arg  
1 5 10

<210> 39  
<211> 14  
30 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

35 <400> 39  
Ala Gly Phe Ser Ser Ala Asp Ala Val Ala Leu Ala Pro Arg  
1 5 10

<210> 40  
<211> 14  
40 <212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

45 <400> 40  
Asp Ala Val Val Ala Asn Leu Val Ala Ala Gly Val Asp Lys  
1 5 10

50 <210> 41  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> artificial

55 <220>  
<223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

<400> 41  
Asp Ala Val Val Ala Asn Leu Val Ala Ala Gly Val Asp Lys Lys  
60 1 5 10 15

<210> 42  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg  
  
 10 <400> 42  
 Ala Gly Phe Ser Ser Ala Asp Ala Val Ala Leu Ala Pro Arg Ile Ala  
 1 5 10 15  
  
 Lys  
  
 <210> 43  
 <211> 18  
 15 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg  
  
 20 <400> 43  
 Ala Thr Leu Ala Ala Thr Ile Ile Pro Asn Ala Leu His Ser Ala Ala  
 1 5 10 15  
  
 Phe Lys  
  
 <210> 44  
 <211> 20  
 25 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 30 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg  
  
 <400> 44  
 Ala Thr Ala Val Ala Ile Ala Ala Thr Ala Leu Asn Pro Ala Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Pro Ile Ala Lys  
 35 20  
  
 <210> 45  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 40 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg  
  
 45 <400> 45  
 Ser Phe Asp Ala Ala Val Ala Thr Ala Ile Val Ser Ser Pro Ile Leu  
 1 5 10 15  
  
 Asn Ala Arg  
  
 <210> 46  
 <211> 33  
 50 <212> PRT  
 <213> artificial

# ES 2 880 795 T3

<220>

<223> fragmento de proteína de P.acnes Pfg

<400> 46

Ser Gly Gly His Ser Gln Gly Gly Ser Gly Thr His Tyr Ile His His  
1 5 10 15

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

5 Phe

<210> 47

<211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> fragmento Fg1

15 <400> 47

Met Lys Arg Met Val Ser Trp Ser Phe His Lys Leu Lys Thr Met Lys  
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Phe Leu Val Lys Ser Gln Gly  
20 25 30

Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg Gly His Arg Pro  
35 40 45

Leu Asp Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu Arg Pro Ala Pro Pro  
50 55 60

Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Arg Pro Ala Lys Ala Ala Ala  
65 70 75 80

Thr Gln Lys Lys Val Glu Arg Lys Ala Pro Asp Ala Gly Gly Cys Leu  
85 90 95

His Ala Asp Pro Asp Leu Gly Val Leu Cys  
100 105

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos 80% con SEC ID N°: 1 después de una alineación global óptima o su fragmento que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de por lo menos 80% con cualquiera de SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 después de una alineación global óptima, para la utilización como un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel.
2. Polipéptido aislado para la utilización según la reivindicación 1, que comprende SEC ID N°: 1 o su fragmento que comprende cualquiera de SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47.
3. Polipéptido aislado para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido se selecciona de entre SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 o un polipéptido con una identidad de por lo menos 80% con una de SEC ID N°: 2, 5 y 7 a 13 y 47 después de una alineación global óptima.
4. Polipéptido aislado o su fragmento para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad inflamatoria de la piel es el acné.
5. Polipéptido aislado o su fragmento para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es apto para inhibir la interacción con fibrinógeno de por lo menos una proteína microbiana implicada en la adhesión bacteriana a la célula hospedadora, en el que la bacteria es preferentemente *P. acnes* y el fibrinógeno es preferentemente fibrinógeno humano.
6. Polipéptido aislado o su fragmento para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad inflamatoria de la piel es la psoriasis.
7. Fragmento de 5 a 20 aminoácidos, preferentemente 5 a 15 aminoácidos, de SEC ID N°: 1, comprendiendo dicho fragmento una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre una de SEC ID N°: 7 a 12, o un fragmento seleccionado de entre SEC ID N°: 2, 5, 13 y 47.
8. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica el fragmento según la reivindicación 7.
9. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 8.
10. Célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 8 o el vector según la reivindicación 9.
11. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto seleccionado de entre el fragmento según la reivindicación 7, la molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 8, el vector según la reivindicación 9 y la célula hospedadora según la reivindicación 10; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 8, vector según la reivindicación 9, célula hospedadora según la reivindicación 10 o composición farmacéutica según la reivindicación 11, para la utilización como un medicamento.
13. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 8, vector según la reivindicación 9, célula hospedadora según la reivindicación 10 o composición farmacéutica según la reivindicación 11, para la utilización en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel.
14. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 8 o vector según la reivindicación 9, para la utilización en el tratamiento y/o la prevención de psoriasis o acné.
15. Producto de combinación que comprende:
  - por lo menos un compuesto seleccionado de entre el fragmento según la reivindicación 7, la molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 8, el vector según la reivindicación 9 y la célula hospedadora según la reivindicación 10; y
  - otro agente farmacéutico, preferentemente utilizado para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias de la piel seleccionadas de entre psoriasis y/o acné, preferentemente acné;

para la utilización simultánea, separada o secuencial como un medicamento.

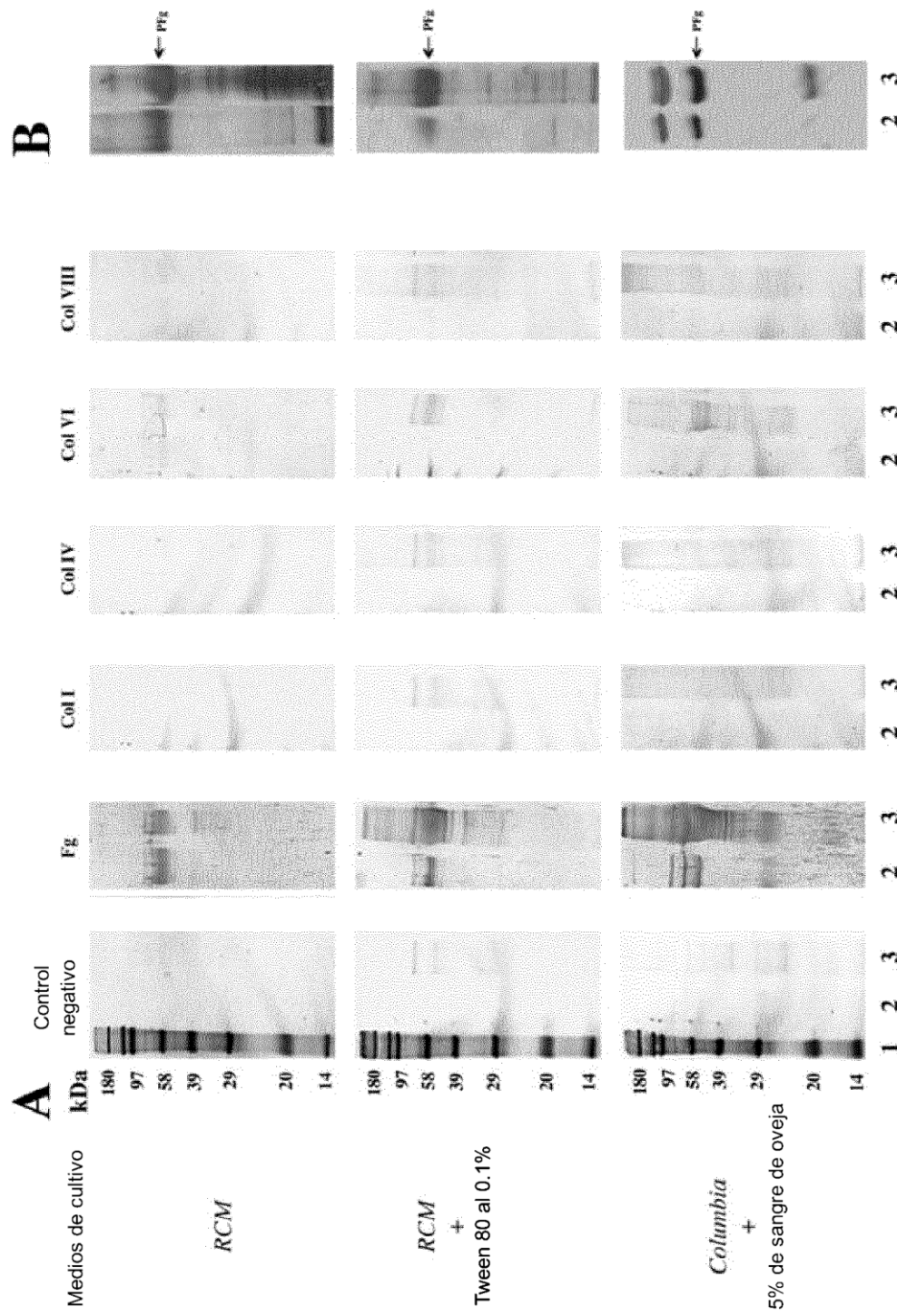


Figura 1

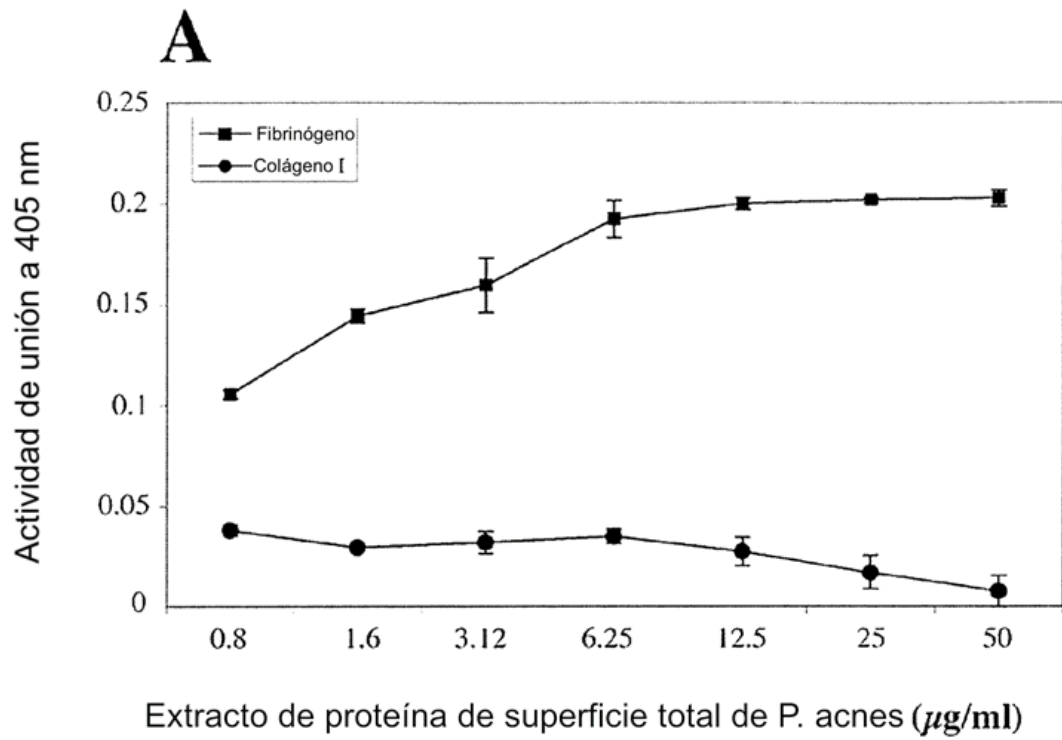


Figura 2A

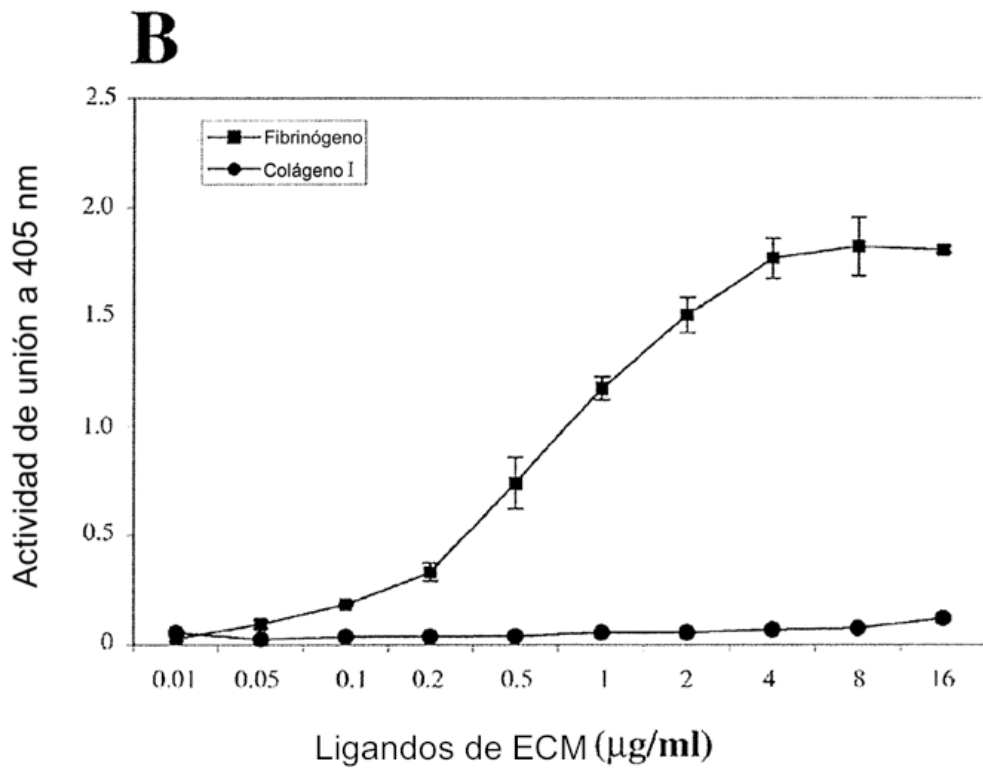


Figura 2B

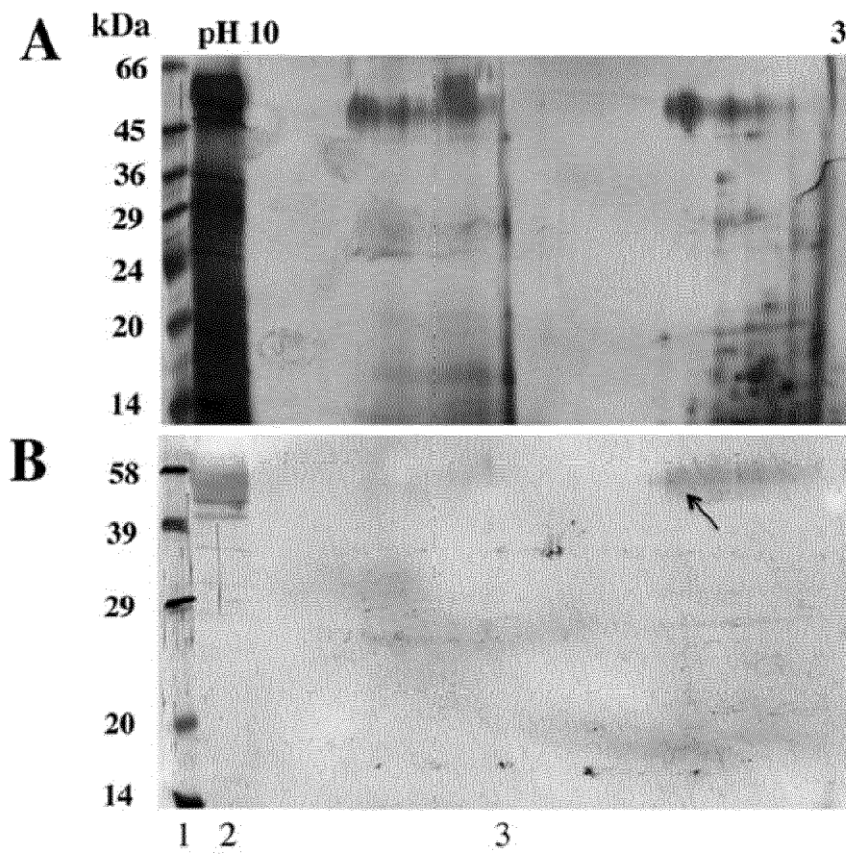


Figura 3

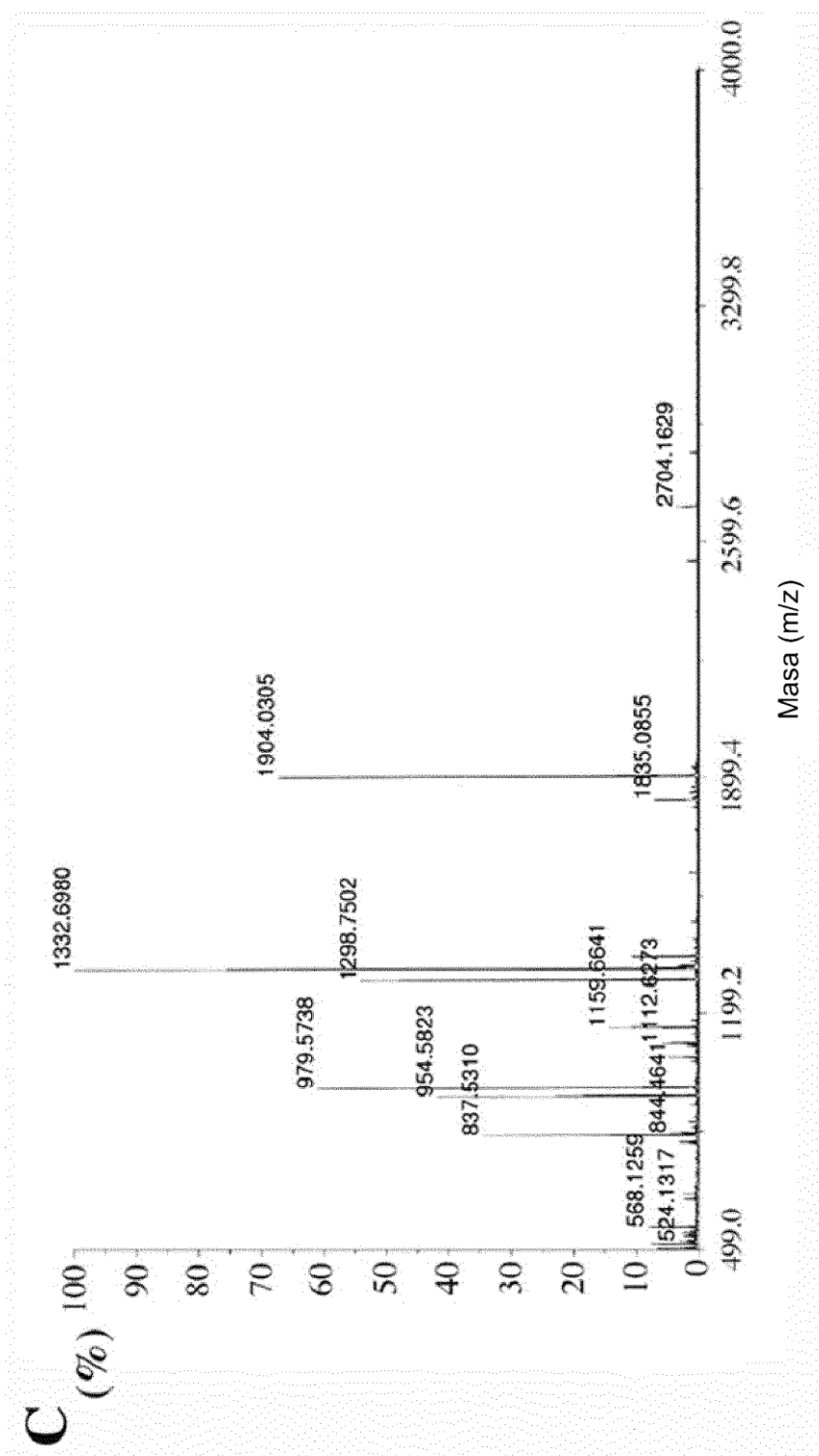


Figura 3

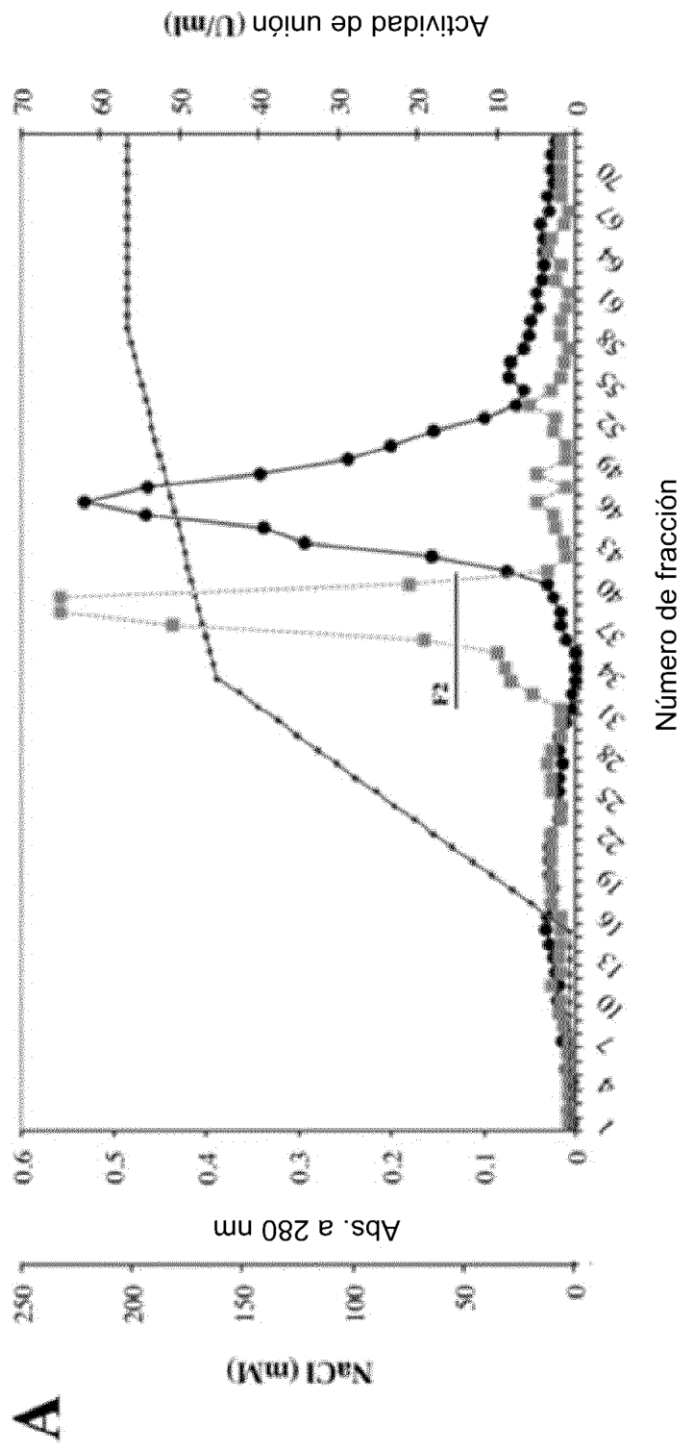


Figura 4

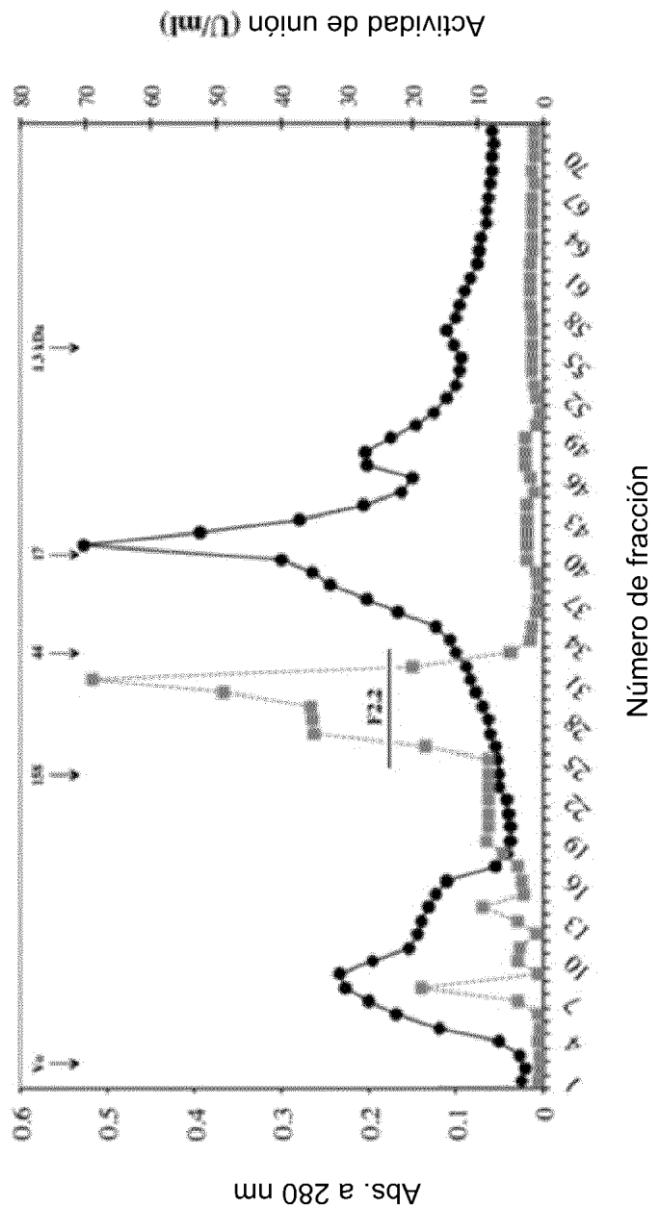


Figura 4

**B**

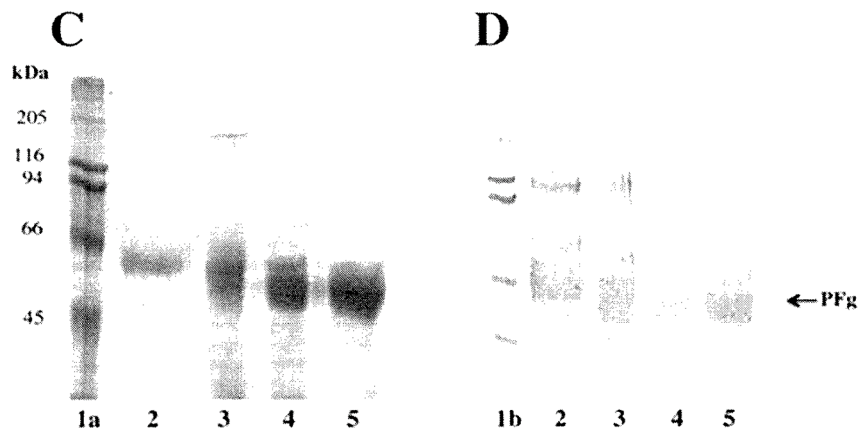


Figura 4

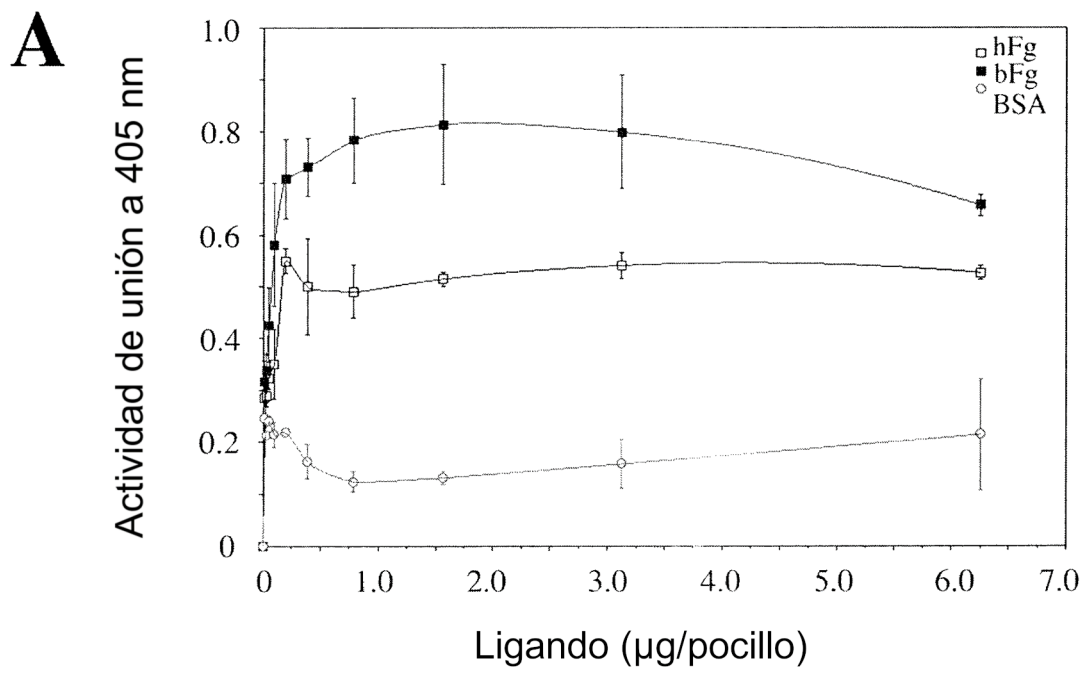


Figura 5

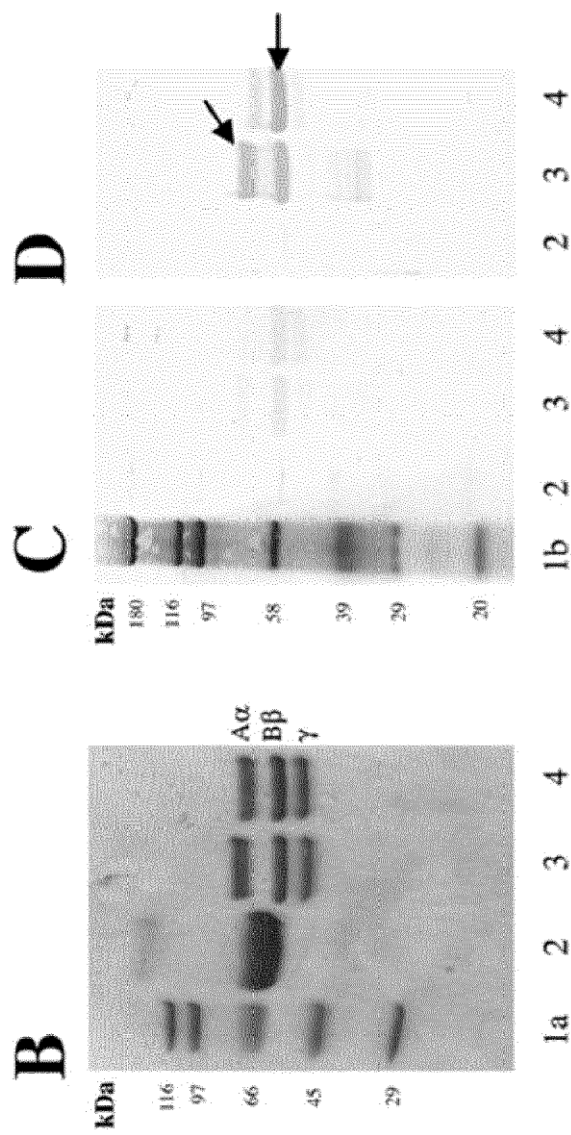


Figura 5

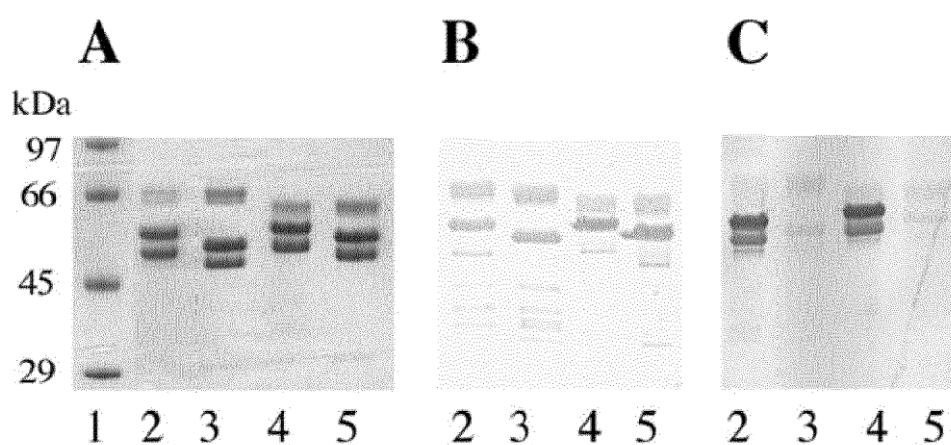


Figura 6

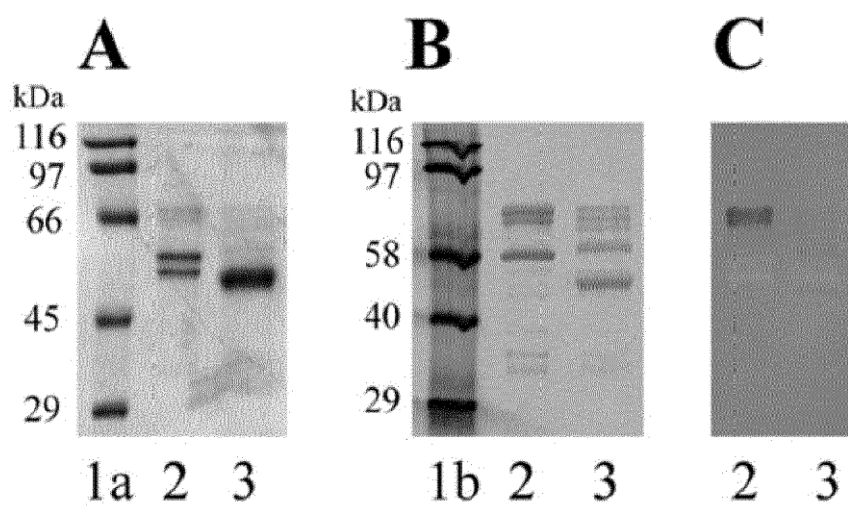


Figura 7

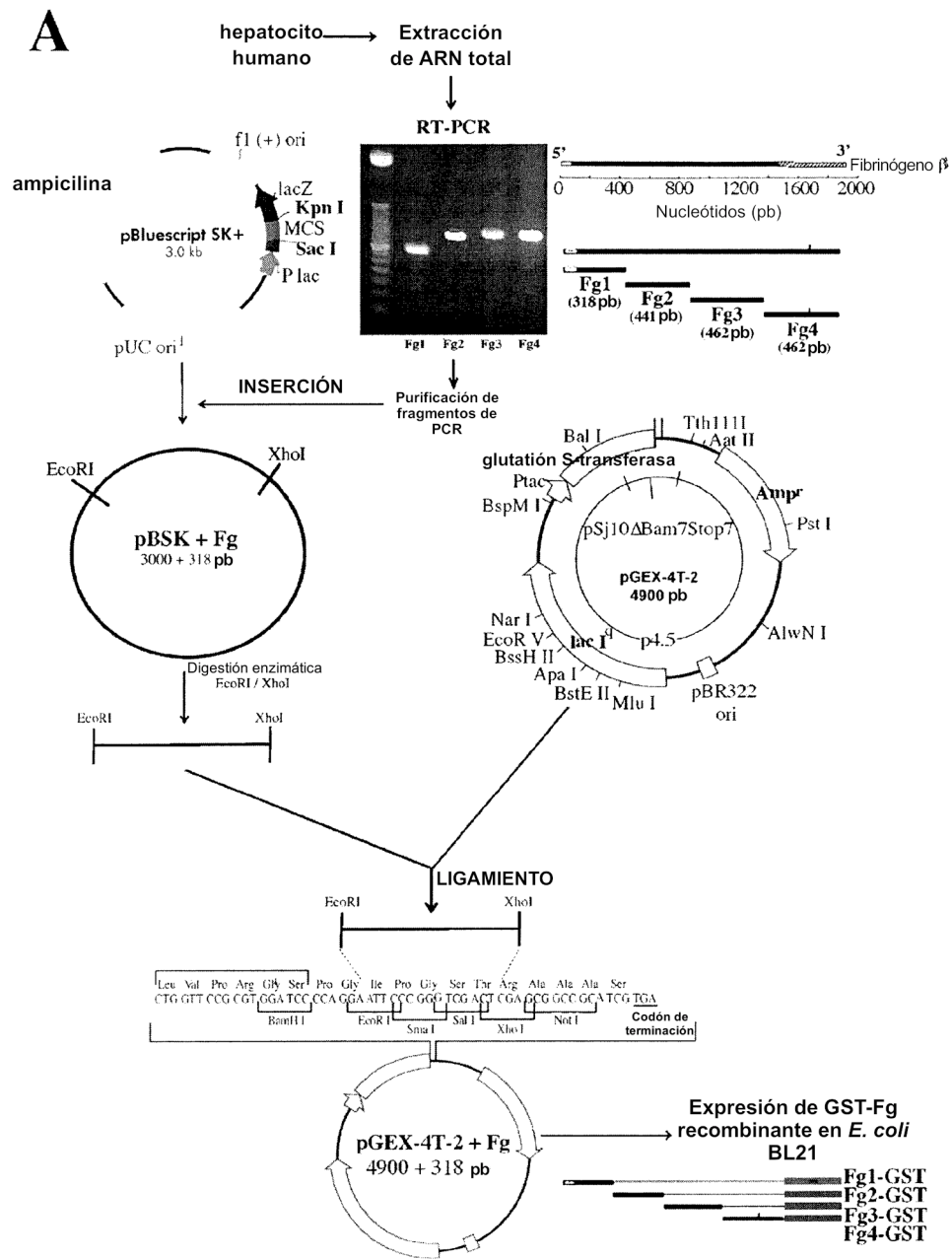


Figura 8

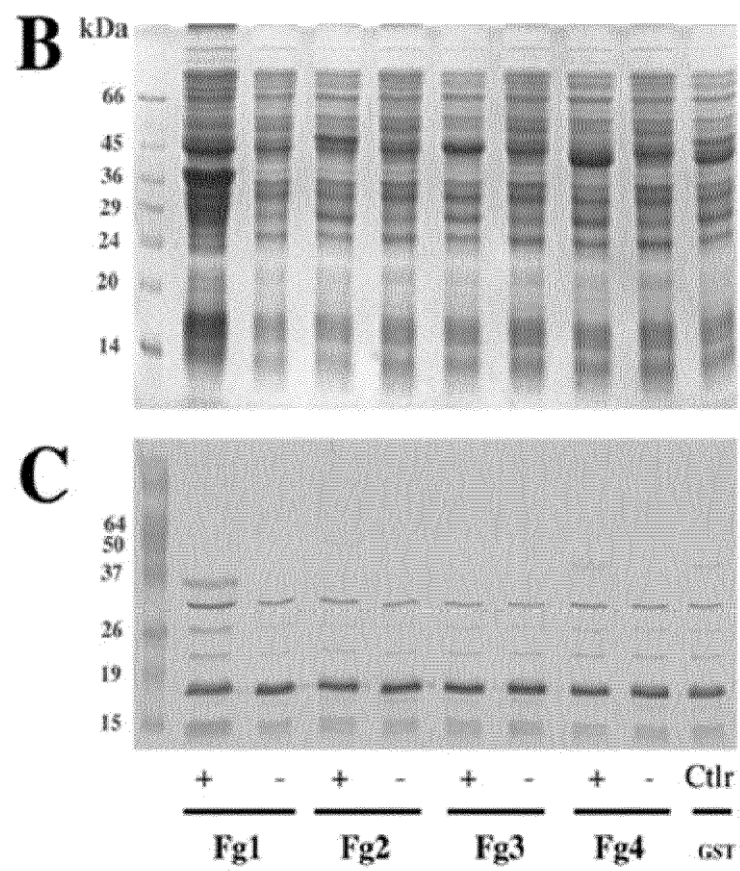


Figura 8

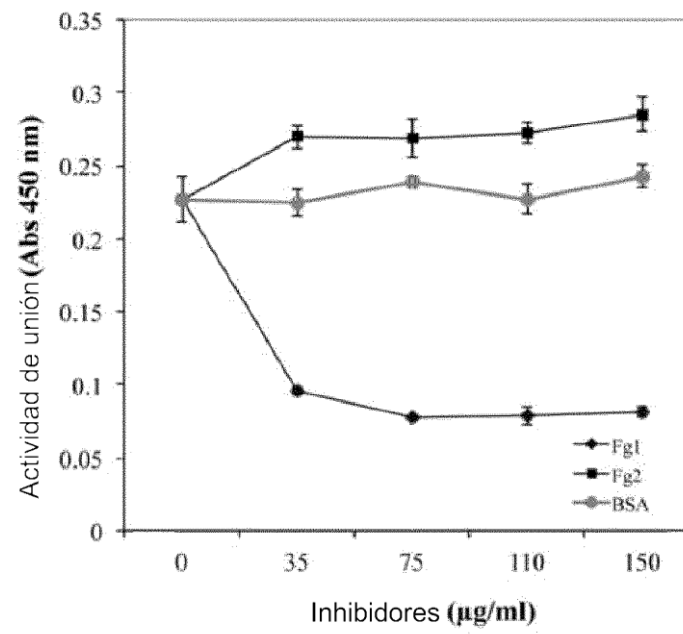


Figura 9

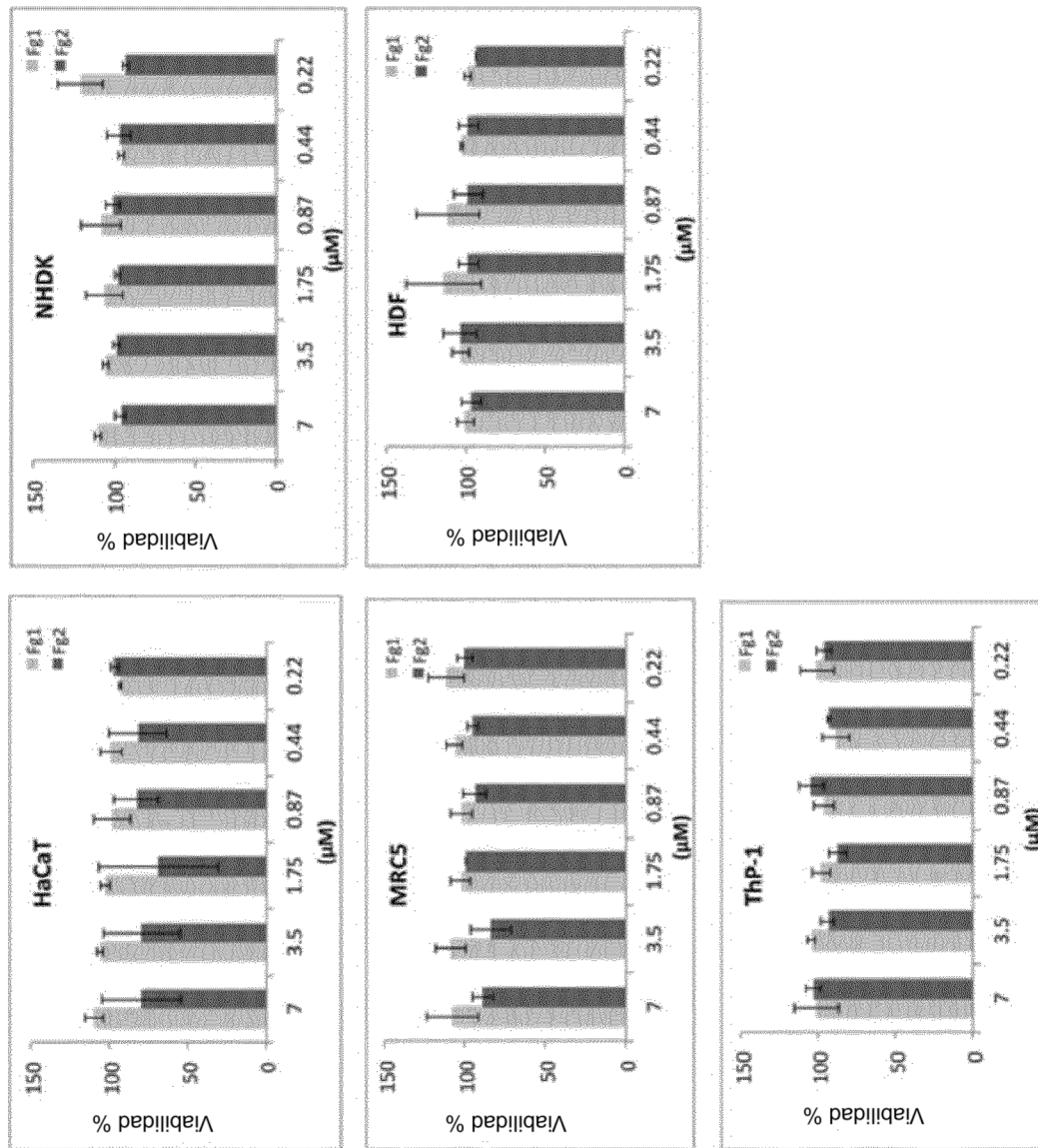


Figura 10

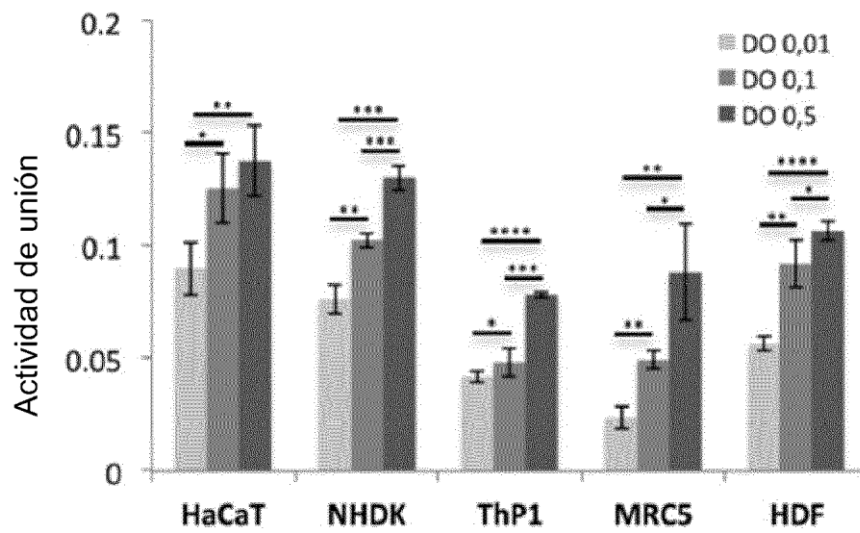


Figura 11

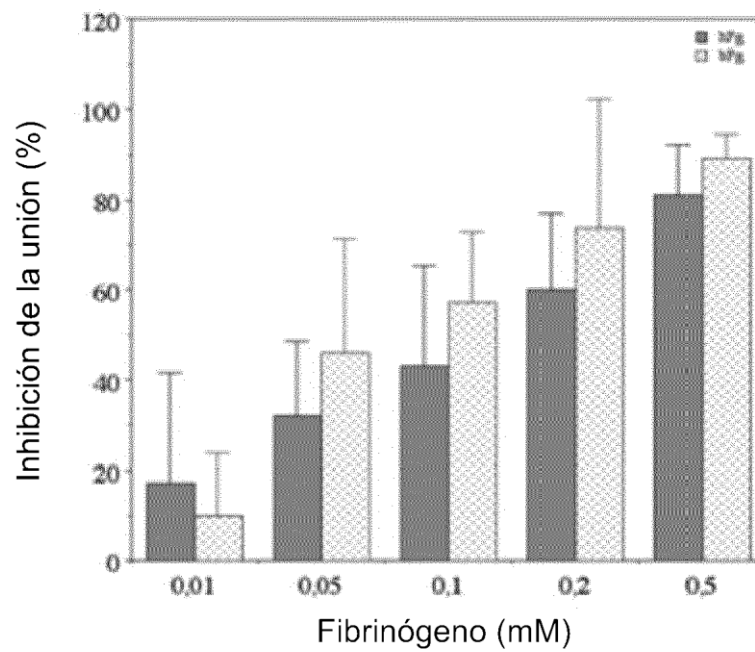


Figura 12

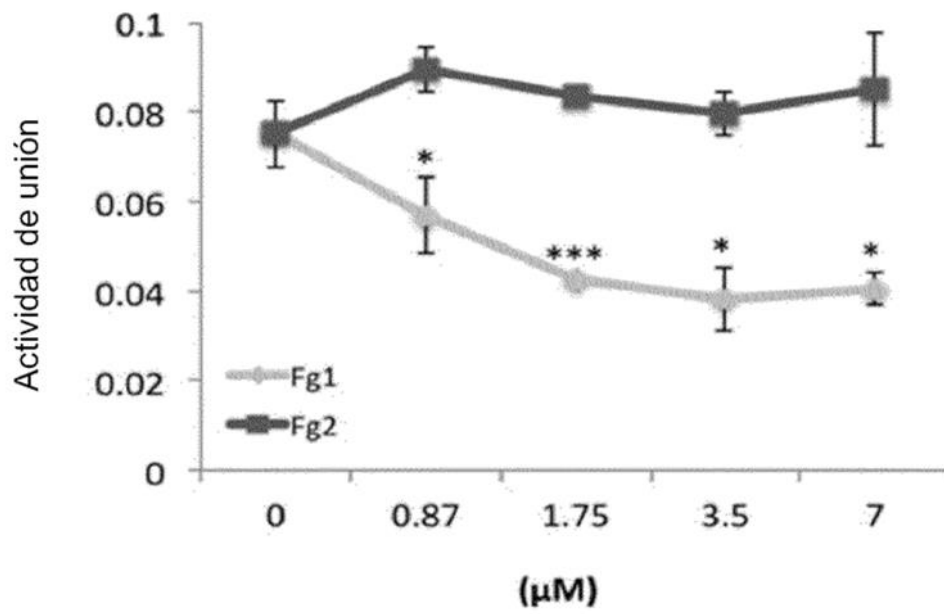


Figura 13

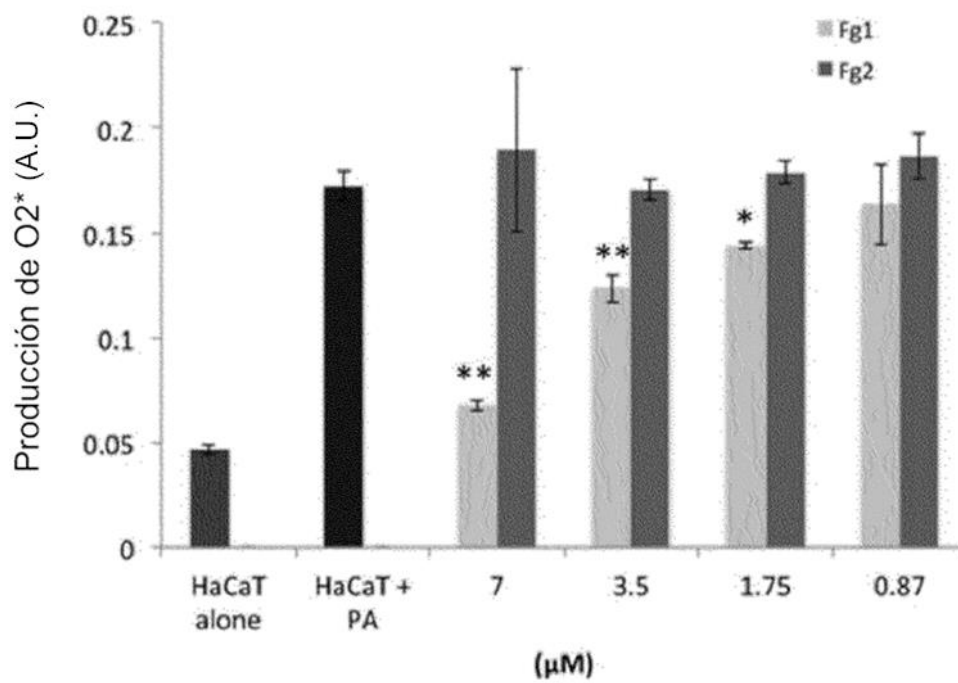


Figura 14

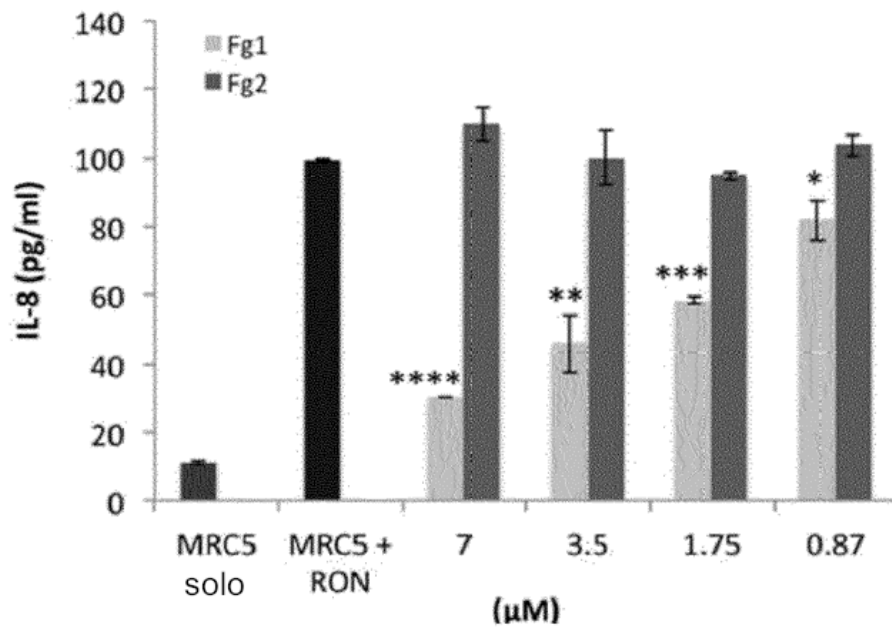


Figura 15

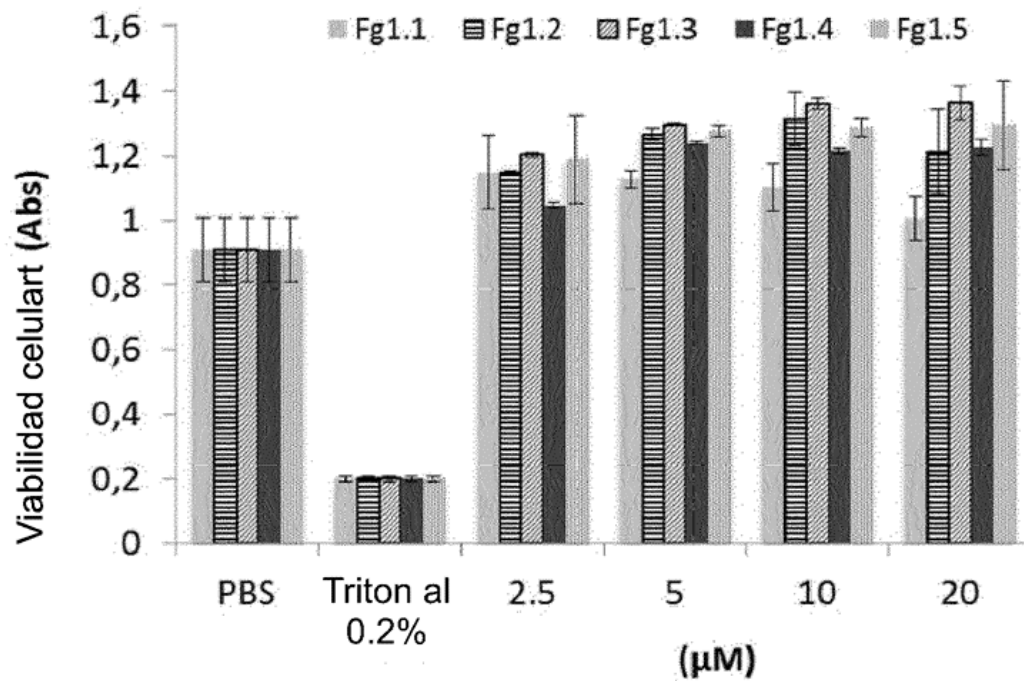


Figura 16

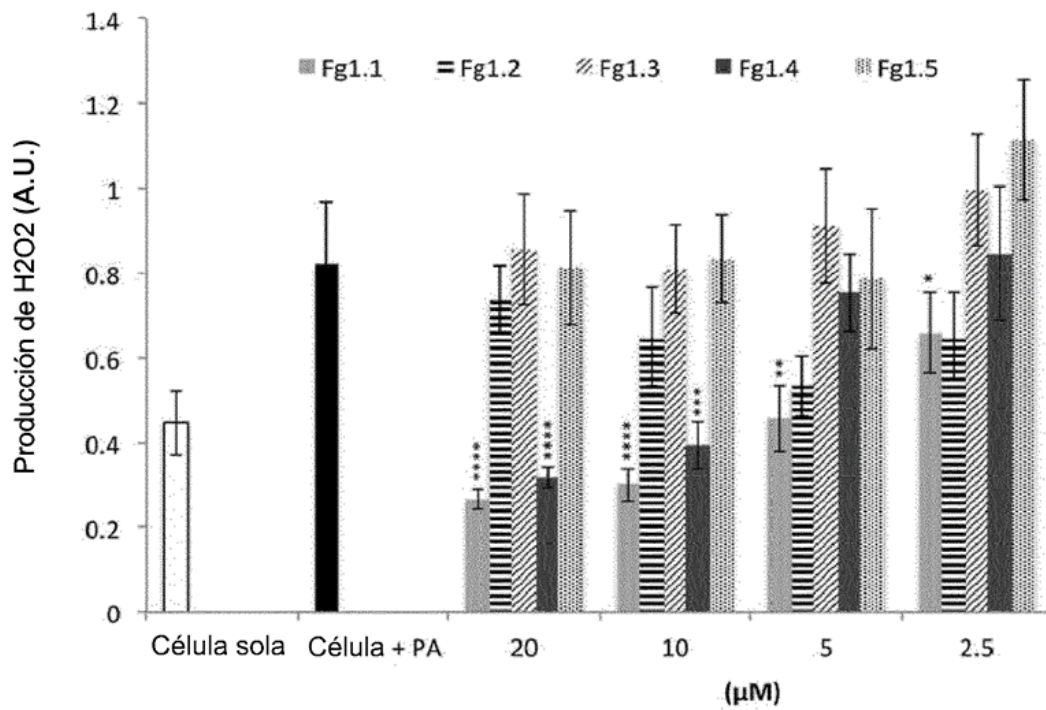


Figura 17

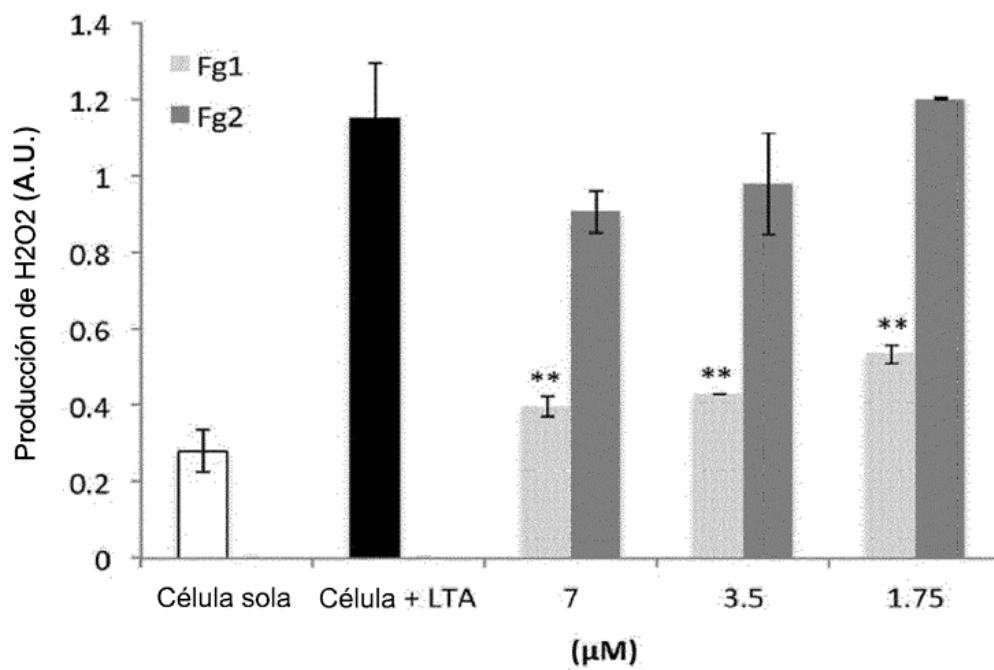
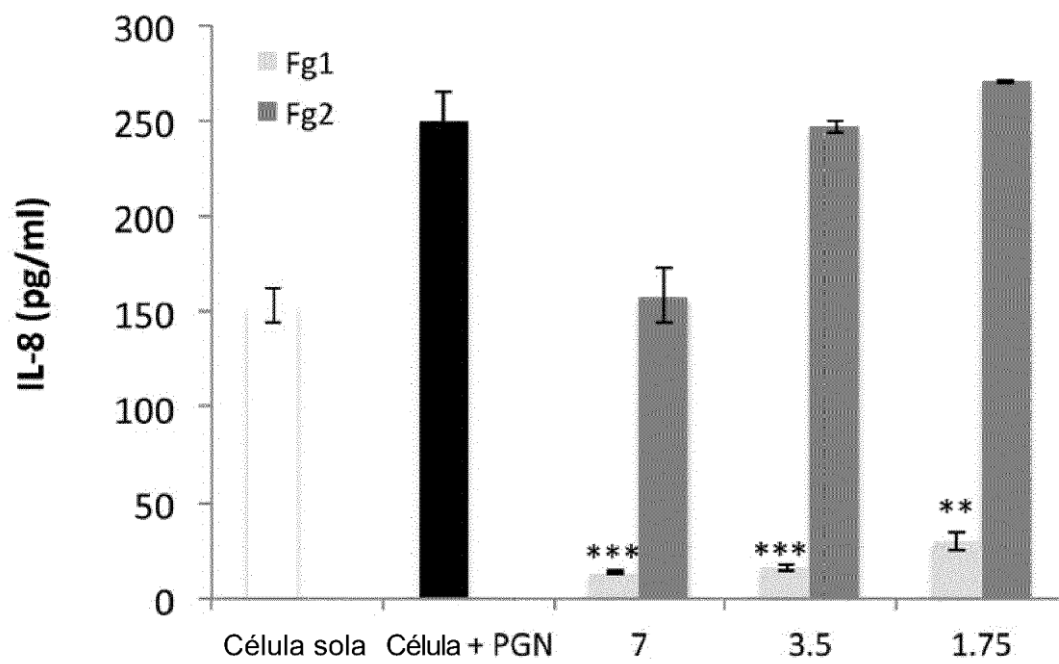


Figura 18



>

Figura 19

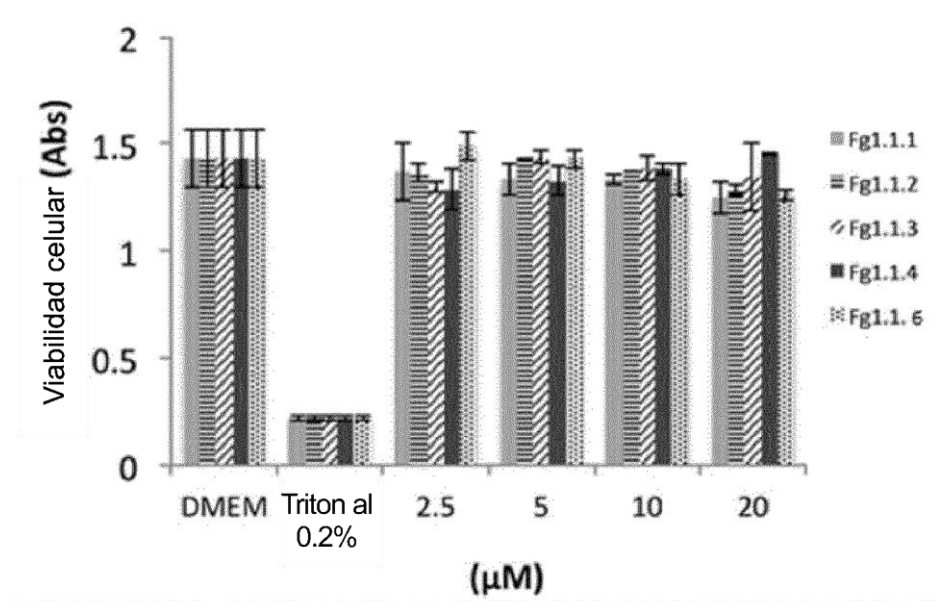


Figura 20

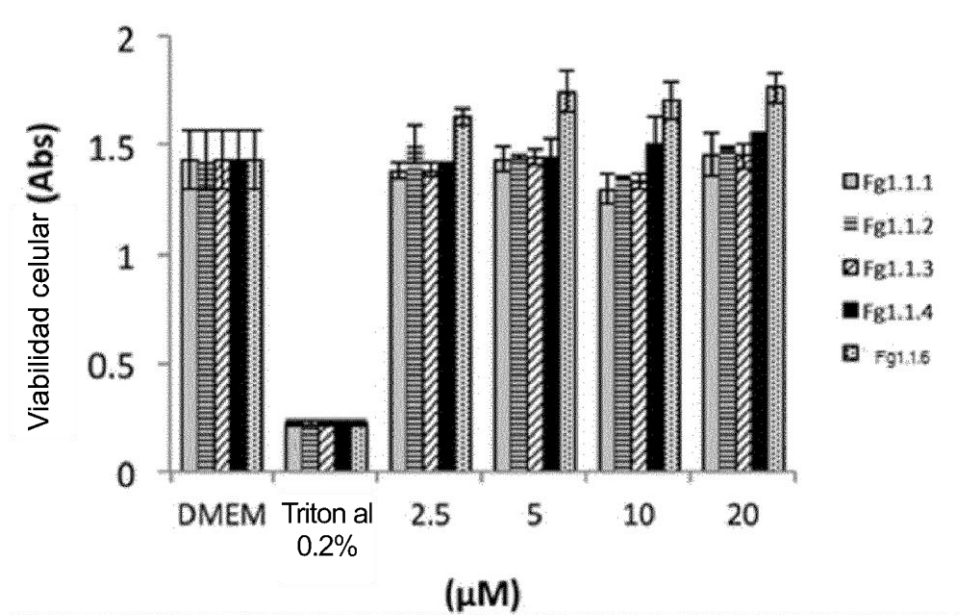


Figura 21

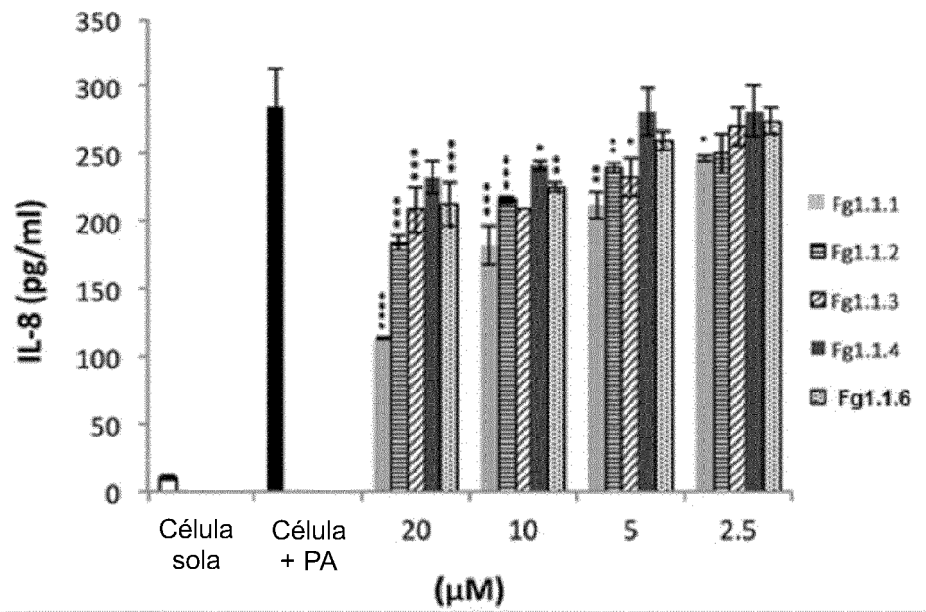


Figura 22

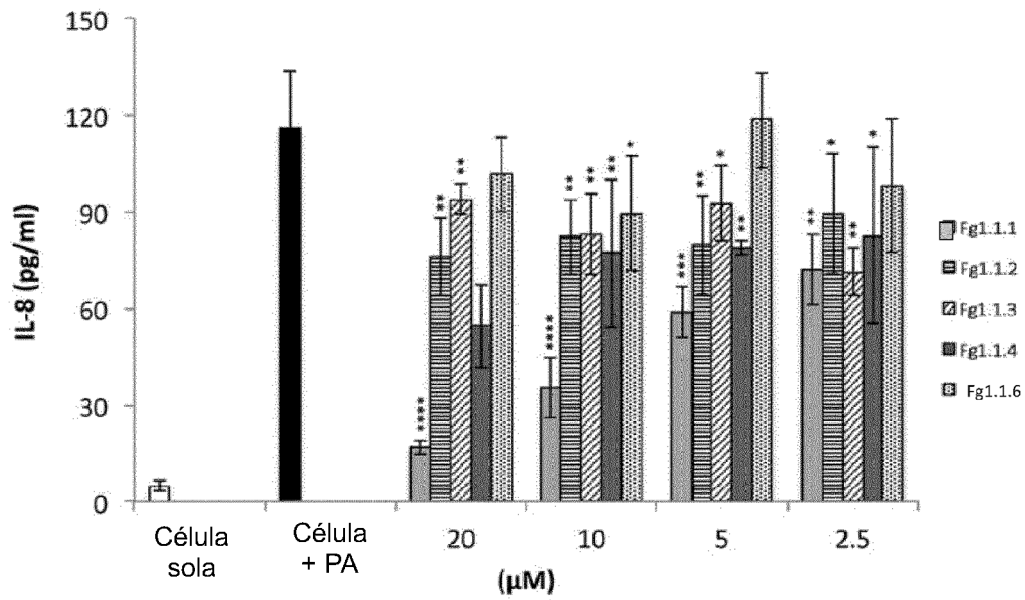


Figura 23

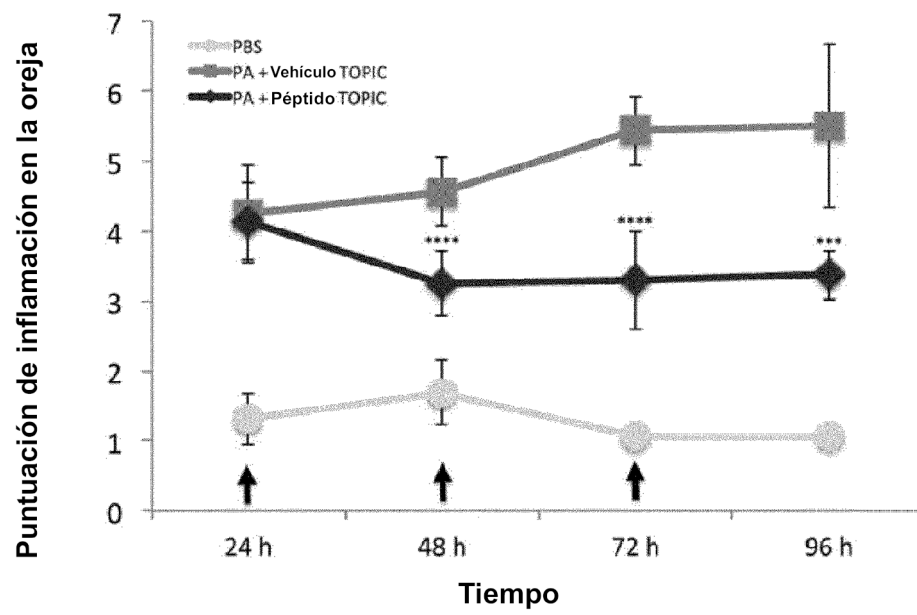


Figura 24

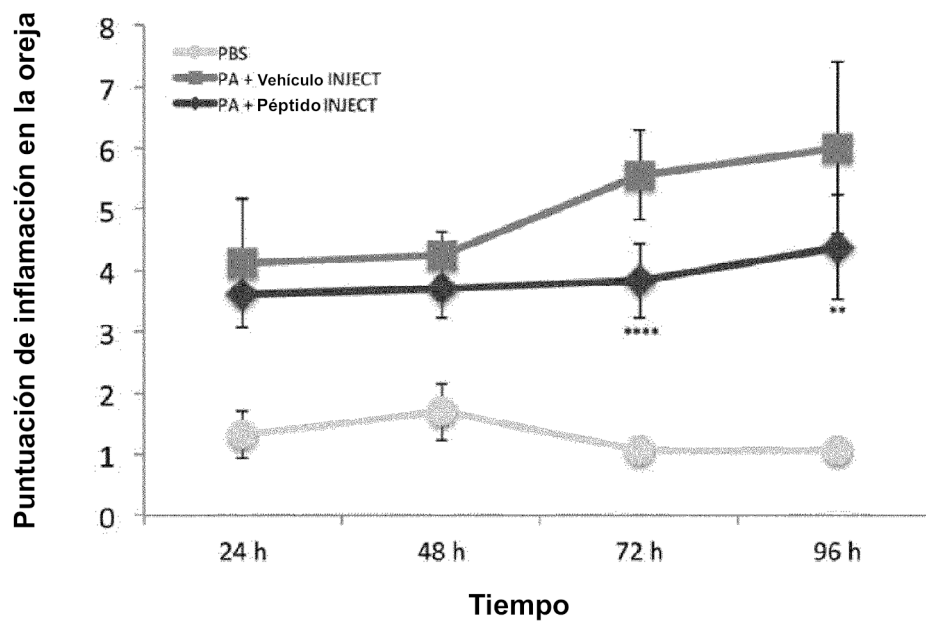


Figura 25

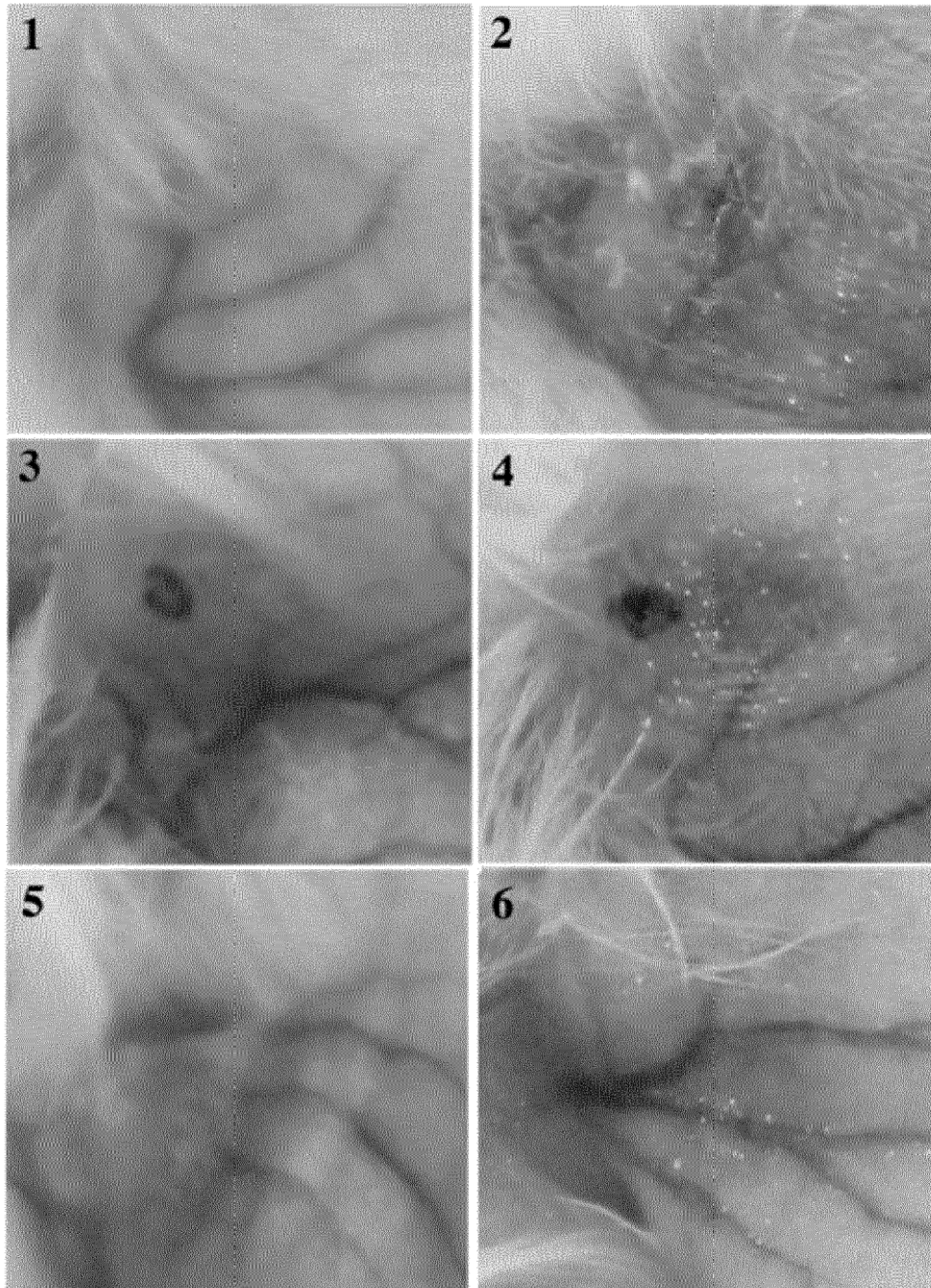


Figura 26

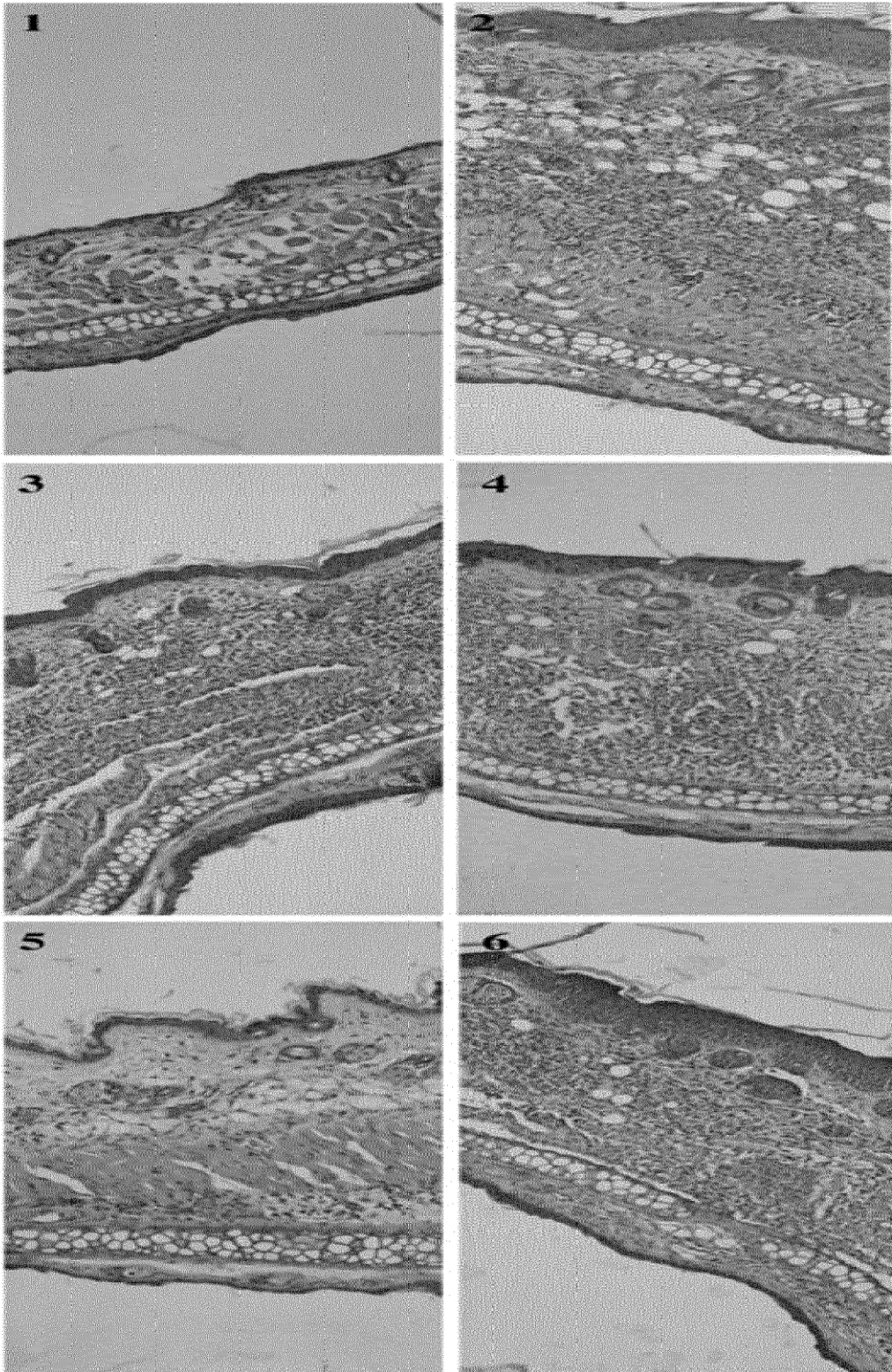


Figura 27

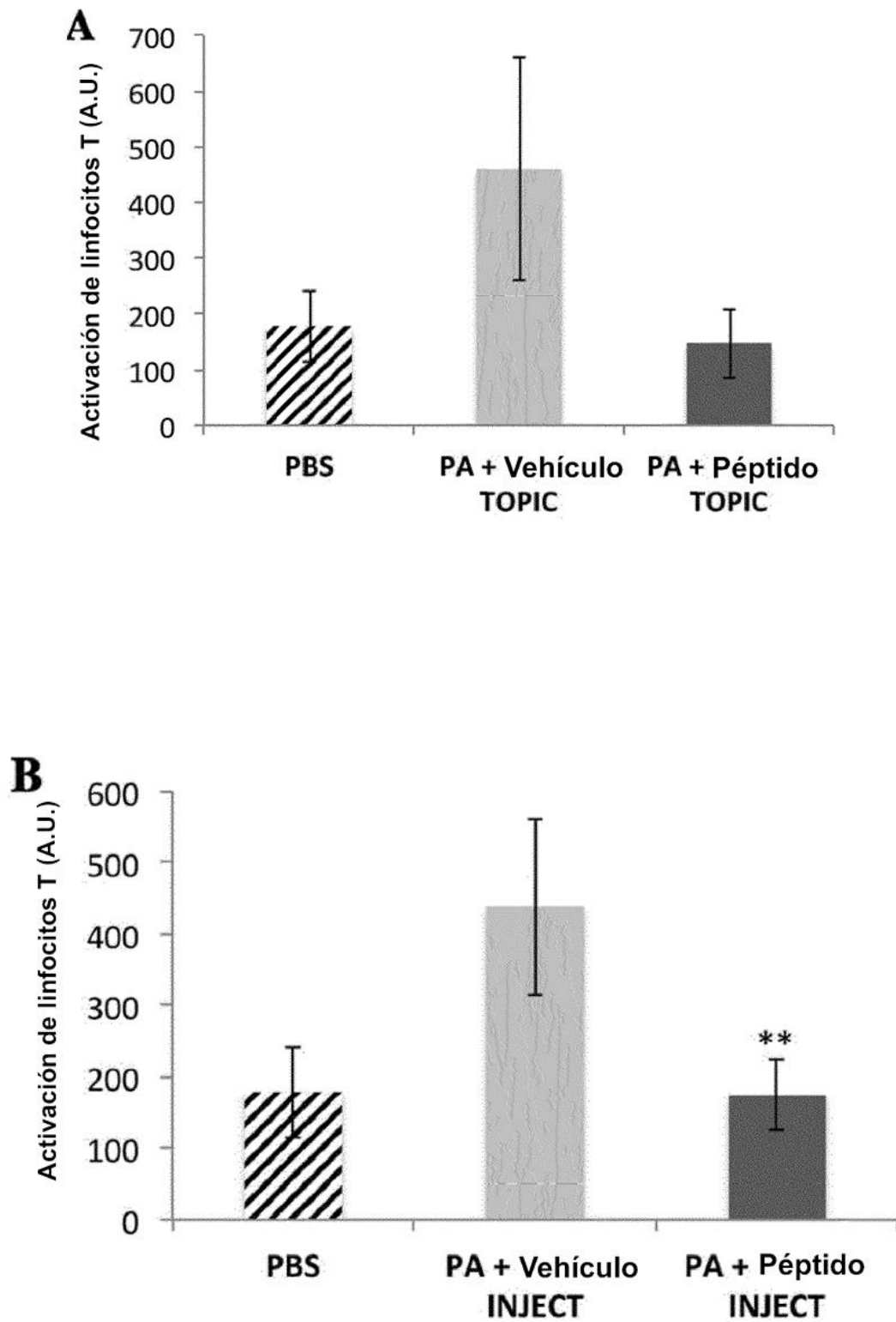


Figura 28

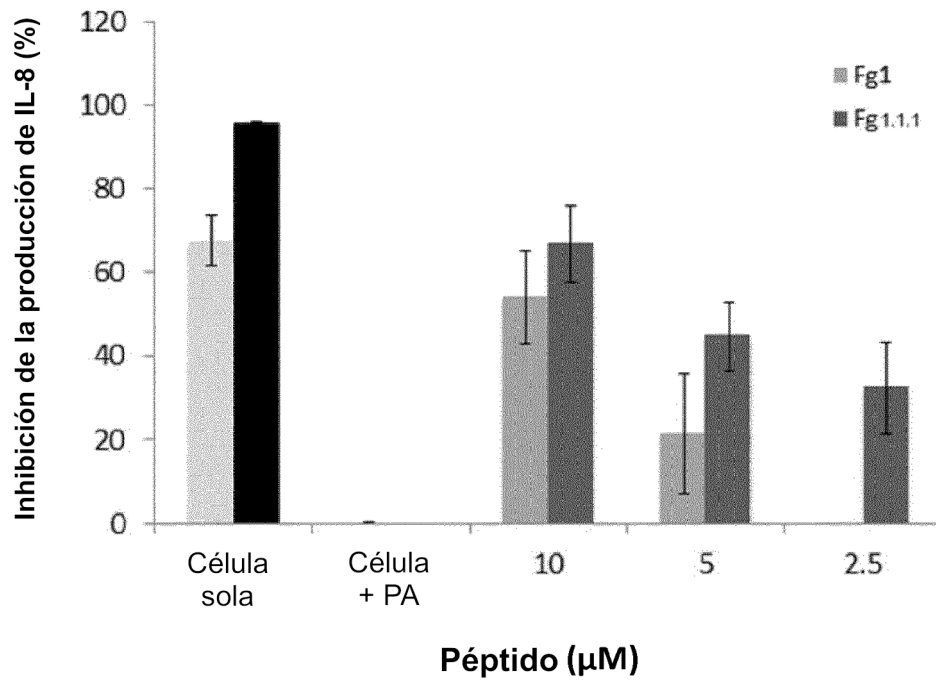


Figura 29

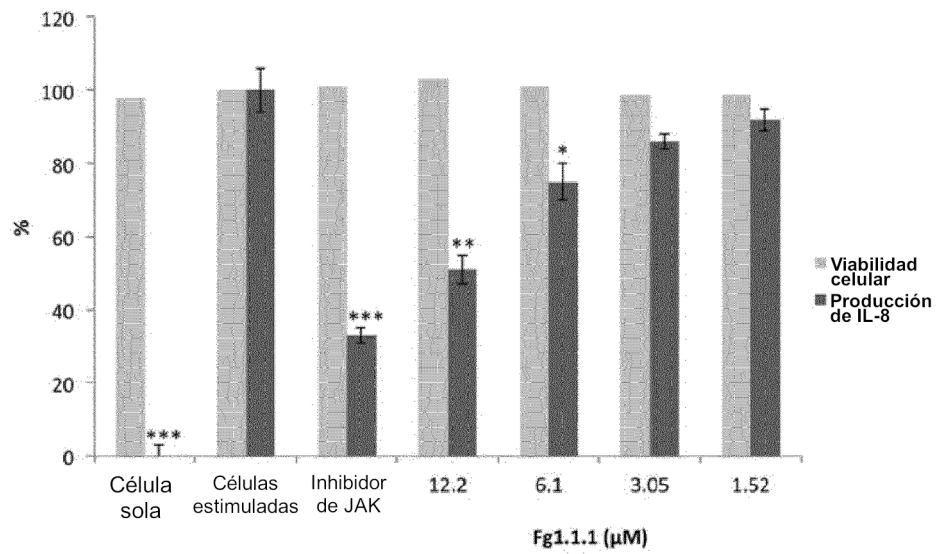


Figura 30

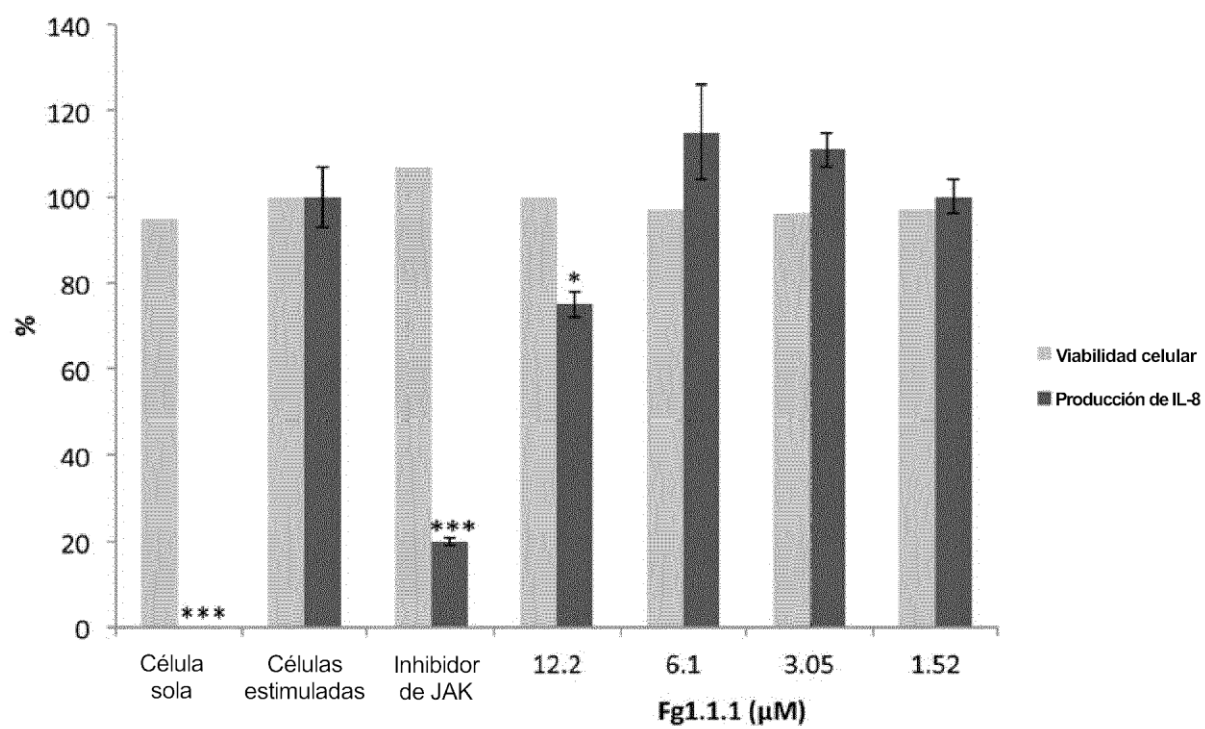


Figura 31