(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 694 782**

(51) Int. CI.:

A61K 38/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.12.2013 PCT/EP2013/003917**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102009**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2013 E 13831825 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2938353**

(54) Título: **Péptidos antiinflamatorios**

(30) Prioridad:

26.12.2012 EP 12008611

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2018

(73) Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) (100.0%)
147 rue de l'Université
75007 Paris, FR

(72) Inventor/es:

LANGELLA PHILIPPE;
PIGNEUR-ARNAUD, BÉNÉDICTE;
CHATEL, JEAN-MARC;
TRUGNAN, GERMAIN;
QUEVRAIN, ELODIE;
SEKSIK, PHILIPPE;
BERMUDEZ-HUMARAN, LUIS G.;
CHAIN, FLORIAN;
MAUBERT, MARIE-ANNE;
SOKOL, HARRY y
MICHON, CHRISTOPHE

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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 antiinflamatorios.

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

La inflamación es un proceso biológico natural, que constituye una parte normal de la respuesta a lesiones o infecciones. Este proceso contribuye a la protección del organismo contra agresiones internas o externas. No obstante, una disfunción de los mecanismos inflamatorios, particularmente una inflamación persistente o muy abundante, puede causar dolor importante y enfermedades potencialmente mortales. Dichas enfermedades comprenden trastornos de la piel, trastornos intestinales, algunos trastornos neurológicos, artritis, enfermedades autoinmunes. Varias de estas enfermedades inflamatorias todavía no tienen un tratamiento o un tratamiento suficiente. Por tanto, estudiar y encontrar nuevas estrategias de tratamiento antiinflamatorio constituye una cuestión importante en medicina e investigación biomédica.

La enfermedad inflamatoria de los intestinos abarca un grupo de trastornos caracterizados por una inflamación crónica y recurrente del tubo digestivo. La forma más frecuente de este grupo es la enfermedad de Crohn. La patogénesis implica una activación inadecuada y continua del sistema inmune de las mucosas promovida por la presencia de la microbiota intestinal en un paciente con predisposición genética.

Se ha demostrado que *faecalibacterium prausnitzii,* una bacteria comensal estrictamente anaerobia, está disminuida en pacientes con enfermedad de Crohn en el íleon, tanto en las heces como en el compartimiento mucoso. Su disminución se asocia con una recurrencia temprana de la enfermedad en el modelo de recurrencia posoperatoria después de disección ileocecal. El sobrenadante de cultivo de *F. prausnitzii* ejerce una actividad antiinflamatoria en modelos murinos *in vitro* e *in vivo* de colitis inducida por TNBS.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de los presentes inventores de las propiedades antiinflamatorias de una proteína (y de seis de sus fragmentos derivados) de la bacteria *Faecalibacterium prausnitzii.*

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

Particularmente, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal. Preferiblemente, dicha enfermedad inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

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

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, una secuencia de ácido nucleico, un vector o una célula hospedante de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Finalmente, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, una secuencia de ácido nucleico, un vector o una célula hospedante de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el efecto de la proteína ZP05614546.1 sobre la activación de NF-kB dependiente de Carma-1 usando células HEK293T e indicador de luciferasa NFκB.

MAM= transfección del plásmido MAM que comprende la proteína ZP05614546.1; EMAM = transfección del plásmido MAM vacío

Ecarma1 : transfección del plásmido Carma 1 vacío.

La Figura 2 muestra el efecto de la proteína ZP05614546.1 sobre la activación de NFκB dependiente de LPS usando células HEK293T que expresan establemente TLR4, MD2 y CD14 e indicador de luciferasa NFκB. *MAM= transfección del plásmido MAM que comprende la proteína ZP05614546.1; EMAM = transfección del plásmido MAM vacío.*

La Figura 3 muestra alineaciones de secuencias homólogas de la proteína de la invención.

** : Identidad de aminoácidos,* : *: Gran homología de aminoácidos, . : Homología de aminoácidos.*

La Figura 4 muestra un efecto antiinflamatorio de los péptidos definidos por la SEQ ID NO:20-21 sobre células HT29-MTX, mediante una evaluación de la producción de IL8 después de la estimulación de células HT29-MTX incubadas o no con dichos péptidos y estimuladas por TNFα.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos de la invención

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

La expresión "enfermedad inflamatoria" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier enfermedad y afección asociada con inflamación. La expresión incluye, entre otros, (1) enfermedades inflamatorias o alérgicas tales como anafilaxis sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a medicamentos, alergias a picaduras de insectos; enfermedades inflamatorias de los intestinos como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, ileítis y enteritis; vaginitis; psoriasis y dermatosis inflamatorias como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, urticaria; vasculitis; espondoloartropatías; esclerodermia; enfermedades respiratorias alérgicas como asma, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares de hipersensibilidad y similares, (2) enfermedades autoinmunes como artritis (reumatoidea y psoriásica), artrosis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus, glomerulonefritis y similares, (3) rechazo de injertos (incluido rechazo de injerto y enfermedad injerto contra hospedante), y (4) otras enfermedades en donde se deben inhibir respuestas inflamatorias indeseadas (p. ej., aterosclerosis, miositis, trastornos inflamatorios del SNC como accidentes cerebrovasculares y traumatismo de cráneo cerrado, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, encefalitis, meningitis, osteoporosis, gota, hepatitis, nefritis, septicemia, sarcoidosis, conjuntivitis, otitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sinusitis y síndrome de Bechet).

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

En una realización preferida de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es enfermedad de Crohn.

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

En otra realización particular, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria que resulta de una activación de la vía de NFκB.

El polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1. Dicha secuencia corresponde a una secuencia de consenso entre por lo menos cinco secuencias de proteínas ortólogas.

SEQ ID NO:1	MMMPANX1X2X3X4X5X6X7X8X9X10X11VX12GGX13X14X15X16X17X18X19X20 X21X22X23X24X25 X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37N X38X39X40 X41X42X43NX44X45X46X47X48X49X50 X51X52X53X54X55X56 X57FX58GX59X60X61X62 X63X64X65X66X67X68X69 X70X71X72X73X74X75
	X76X77X78X79 X80X81X82 X83X84X85 X86X87X88X89 X90X91X92X93 X94X95X96 X97X98X99X100 X101X102X103 X104X105X106 X107X108X109X110GX111X112X113 X114X115 YX116LGX117 X118X119X120 X121 X122X123X124 X125X126X127X128 X129X130X131X132 X133 X134X135X136X137X138 X139X140X141X142 X143X144X145 X146X147X148X149

	En donde X1= F,Y; X2= S,T; X3=A,V; X4=V,I; X5=S,A,N; X6=E, -; X7=N, - ; X8=E, - ; X9=M,S,A; X10=T,E ; X11=Y,V; X12=M,V,N,Y; X13=S,A; X14=N,D, -; X15=F,L, -; X16=I,F, -; X17=D,T, -; X18=A,I, -; X19=V,L,I; X20=A,V,G; X21=A,D; X22=Y,V,T; X23=L,T; X24=A,P; X25=P,S ; X26=A,I; X27=M,W; X28=G,T,N ; X29=A,T,L; X30=A,D,E; X31=Q,N,S; X32=W,V ; X33=Q,K ; X34=N,T,K,R ; X35=F,V; X36=H,S,N; X37=K,A,T,S; X38=L,V,I; X39=I,V; X40=T,K; X41=I,L; X42=V,I; X43=G,S; X44=K,S,T; X45=Y,F; X46=V,L,F,T; X47=Q,A,K,S; X48=G,K,S,H; X49=F,Y,T,L; X50=L,T,I,V; X51=D,N,S,K; X52=N,D,R,A; X53=T,V; X54=V,L,I; X55=G,A; X56=A,Q,V,T; X57=V,M,L; X58=S,D,G; X59=T,N,S; X60=W,Y, -, X61=T,V,G, X62=P,T,K,S, X63=G,W,D, X64=D,K,G, X65=G,E,D,V, -, X66=L,V,K,T, X67=T,I,G,L, X68=G,N,F, ;X69=F,Y,I,G; X70=G,S,E,D; X71=G, -; X72=Q, -; X73=F, -; X74=S,V, -; X75=K,T, -; X76=I,N, -; X77=W,L, -; X78=K,D,E,N; X79=D,K,N,G; X80=N,A,L,S,T; X81=Y,F,I; X82=T,N,G,S; X83=D,T,Q, -; X84=N, -; X85=V, -; X86=T,K,F, -; X87=G,D; X88=E,Y,N,L; X89=S,G,P,W,Y; X90=T,I,N; X91=G,F,E,D,V; X92=A,G,K,D,N; X93=Q,G,N,H,R ;X94=K,N,T,L ; X95=F,W,T,P ;X96=G,R; X97=Y,F,D,T,G; X98=G,Y,D,E,-; X99=A,D; X100=L,V,M,Q; X101=G,N,T; X102=V,A,F; X103=V,L,G ; X104=N,-; X105=S,A,K, -; X106=I,G,V,-; X107=L,M,-; X108=N,Q,T,- ; X109=V,I,T,- ; X110=A,L,-; X111=N,G,I,M,L; X112=L,A; X113=A,S; X114=A,V; X115=I,V,G; X116=N,T; X117=F,S,V,T,M; X118=G,S,A,T,K ; X119=T,S,P,D; X120=A,I,T; X121=K,G,A; X122=N,L,V; X123=I,E,T,G,L; X124=V,T,F; X125=G,K,N,A; X126=E,S,D,K; X127=G,T,K; X128=V,T,E,V; X129=Y,L,V,T; X130=K,P,G,N; X131=A,T,FI,S; X132=L,T,N,-; X133=V,G,-; X134=K,Q,-; X135=L,V,-;X136=W,- ; X137=G,-; X138=D,-; X139=L,-; X140=P,-; X141=N,-; X142=N,-; X143=G,-; X144=G,-; X145=S,-; X146=G,-; X147=W,-; X148=V,-; X149=G,-; (- : ningún aminoácido).

Ventajosamente, los polipéptidos de la invención se seleccionan del grupo que comprende las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7.

En una realización particular, dicho polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

SEQ ID NO:2	MMMPANYSVIAENEMTYVNGGANFIDAIGAVTAPIWTLDNVKTFNTNI VTLVGNTFLQSTINRTIGVLFSGNTTWKEVGNIGKNLFGTNVKGNPIEKNNF GDYAMNALGIAAAVYNLGVAPTKNTVKETEVKFTV

En otra realización particular, dicho polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3.

SEQ ID NO:3	MMMPANFSAVSENEM TYVMGGSVADY LAPAM GAAQWQ NFHKNLITI VGNKYV QGFL DNTV GAV FSGTWTP GDGLT GFGGQFSK IWKDNYT DNVTGESTGAQKF GYGALG VVN SILNVA GNL AAIY NLGFGTA KNIVGEGVYKA

En otra realización particular, dicho polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4.

SEQ ID NO:4	MMMP ANFSAVSENEMT YVMGGS VADYLAPAMGAA QWQNFHKNL ITIVGNKY VQGFLDNT VGAMFSGTWTP GDGLTGF GGQFSTIWK KNYT DNVTDEST GAQKF GYGALGVV NSILNVA GNLAAIYNLGF GTAKNI VGEGVYKA

En otra realización particular, dicho polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO:5	MMMPANFS AVAENEMT YVVGGSLV DVLAP AMTTANWQ NVSANVIK IVGNSFLA KYTNDVLAQLFDGN YVP GDVIGYSVK NLDKAYNKGY GTFGGNWG FAVGALNAGMQ ILGGLSAIYTLGS SSIGLETKSGTLPTL

En otra realización particular, dicho polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.

SEQ ID NO:6	MMMPANFTAVNSEVV YGGADLFTIL ADTTAPIWNAANVKKF NTNLITLISNSFFK KTVSNTLGVMFGGNW GKDGDKIFG EEGSINQNV FGLWN DDHTTRTDDMTF GNKVMQVL GMAAVGYTLGTTDAKVGFND GVYGINGKL

En otra realización particular, dicho polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7.

SEQ ID NO:7	MMMPANF SAVNAE V VYGGAVAD YLPSA WTAES VKRFN SNIIT LVS NS FTSHL LKATL GTMFS GSWGSDGV TLF GDNGTFSG LYNV NRLP GGEAQT FG NKIMT TLGLA SVVYT LGMKDAA VLTAK KVT NSNGQV WG D LPNN GGSGWVG

Tal como se emplea en la presente invención, el polipéptido de la invención abarca sus derivados o fragmentos.

De acuerdo con la invención, la expresión "su derivado" tiene su significado general en la técnica y corresponde a una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90% identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácido nucleico referidas respectivamente, particularmente 95%, y preferiblemente 99%. La expresión "porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos" o "porcentaje de identidad entre dos secuencias nucleicas" se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias comparadas, en donde dicho porcentaje se obtiene con la mejor alineación de la secuencia entera. La expresión "la mejor alineación" significa la alineación que permite obtener el porcentaje de alineación más elevado. Se puede realizar usando varios algoritmos y métodos conocidos en la técnica y programas de ordenador basados en dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI USA). Preferiblemente, se usa el algoritmo BLAST.

De acuerdo con la invención, el término "fragmento" se refiere a un polipéptido que es parte de una secuencia de aminoácidos de interés y que tiene una longitud de por lo menos 10 aminoácidos, particularmente por lo menos 15 aminoácidos, más particularmente por lo menos 20 aminoácidos, preferiblemente por lo menos 30 aminoácidos, más preferiblemente por lo menos 40 aminoácidos. Preferiblemente, dicho fragmento tiene una longitud de menos de 120 aminoácidos, particularmente menos de 110 aminoácidos, preferiblemente menos de 100 aminoácidos. El término es aplicable a fragmentos de secuencias de ácidos nucleicos.

De acuerdo con la invención, dicho derivado y/o fragmento de un polipéptido de la invención es un derivado conservador o un fragmento conservador del mismo.

Por "fragmentos conservadores" y "derivados conservadores" de un polipéptido de la invención, se hace referencia respectivamente a fragmentos y derivados que retienen la función, a saber las propiedades antiinflamatorias, de dicho polipéptido de la invención. Más concretamente, un fragmento o un derivado que inhibe la segregación de IL-8 por las células HT29-MTX en por lo menos 50% en una concentración de 100 µM o menos. Dichos fragmentos conservadores y derivados conservadores son equivalentes funcionales de dicho polipéptido. Son "conservadores" porque retienen la función biológica del polipéptido original, más particularmente porque retienen un efecto antiinflamatorio equivalente.

En una realización particular, dicho fragmento conservador de la invención comprende o consiste en un polipéptido seleccionado de la SEQ ID NO:8-18.

SEQ ID NO:8	MMMPANX1X2 X3X4X5X6X7X8X9X10 X11VX12GGX13X14X15 X16X17X18X19X20 X21X22X23X24X25 X26X27X28X29X30 X31X32X33X34X35 X36X37NX38X39X40 X41X42X43NX44X45 X46X47X48X49X50 X51X52X53X54X55 X56X57FX58G
	En donde X1= F,Y; X2= S,T; X3=A,V; X4=V,I; X5=S,A,N; X6=E, -; X7=N, -; X8=E, -; X9=M,S,A; X10=T,E; X11=Y,V; X12=M,V,N,Y; X13=S,A; X14=N,D, -; X15=F,L, -; X16=I,F, -; X17=D,T, -; X18=A,I, -; X19=V,L,I; X20=A,V,G; X21=A,D; X22=Y,V,T ; X23=L,T ; X24=A,P ; X25=P,S ; X26=A,I; X27=M,W; X28=G,T,N; X29=A,T,L; X30=A,D,E; X31=Q,N,S; X32=W,V ; X33=Q,K ; X34=N,T,K,R ; X35=F,V; X36=H,S,N; X37=K,A,T,S; X38=L,V,I; X39=I,V; X40=T,K; X41=I,L; X42=V,I; X43=G,S; X44=K,S,T; X45=Y,F; X46=V,L,F,T; X47=Q,A,K,S; X48=G,K,S,H; X49=F,Y,T,L; X50=L,T,I,V; X51=D,N,S,K; X52=N,D,R,A; X53=T,V; X54=V,L,I ; X55=G,A ; X56=A,Q,V,T; X57=V,M,L; X58=S,D,G;
SEQ ID NO:9	GX111X112X113 X114X115 YX116LG En donde X111=N,G,I,M,L; X112=L,A; X113=A,S; X114=A,V; X115=I,V,G; X116=N,T
SEQ ID NO:10	FS GNTTWKEVGN IGKNLFGTNVKGNPIEKNNFGDYAMNALGIA
SEQ ID NO:11	GNTFLQSTINRTIGVL
SEQ ID NO:12	VGNTFLQSTINRTIGVL
SEQ ID NO:13	LVGNTFLQSTINRTIGVL
SEQ ID NO:14	TLVGNTFLQSTINRTIGVL
SEQ ID NO:15	VTLVGNTFLQSTINRTIGVL
SEQ ID NO:16	NTFLQSTINRTIGVL
SEQ ID NO:17	AAVYNLGVAPTKNTVKETEVKFTV
SEQ ID NO:18	NYSVIAENEMTYVNGGANFIDAIGAVTAPIWTLDNVKTFNTNIVTLV

En otra realización particular, el polipéptido de la invención corresponde a una secuencia de aminoácidos que tiene en la orientación del término N al término C:

- la secuencia SEQ ID NO:8; y
- la secuencia SEQ ID NO:9,

en donde la secuencia SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9 están preferiblemente espaciadas entre 80 y 10 aminoácidos, preferiblemente entre 60 y 15 aminoácidos, y más preferiblemente entre 40 y 20 aminoácidos.

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

Tal como se emplea en la presente memoria, el término polipéptido abarca polipéptidos o proteínas después de las modificaciones post-traducción como glucosilación, fosforilación u otras modificaciones de algunos residuos de aminoácidos.

La presente invención se refiere por lo tanto a un polipéptido descrito para uso como fármaco antiinflamatorio.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "fármaco antiinflamatorio" se refiere a un fármaco que reduce directa o indirectamente la inflamación en un tejido.

Un polipéptido de la invención se puede producir por métodos de síntesis de péptidos automáticos o por expresión recombinante. El experto en la técnica conoce los principios generales para diseñar y elaborar péptidos y proteínas.

Un polipéptido de la invención se puede sintetizar en una disolución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Se comercializan distintos sintetizadores automáticos y se pueden utilizar de acuerdo con protocolos conocidos. Un polipéptido de la invención puede además sintetizarse por tecnología de fase sólida empleando un sintetizador de péptidos ilustrativo tal como MODEL 433A de APPLIED BIOSYSTEMS INC. La pureza de cualquier proteína determinada; generada por síntesis de péptidos automatizada o por métodos recombinantes se puede determinar empleando análisis HPLC de fase inversa. La autenticidad química de cada péptido puede establecerse por cualquier método conocido por el experto en la técnica.

Como una alternativa a la síntesis de péptidos automatizada, se puede emplear tecnología de ADN recombinante, en donde una secuencia nucleotídica que codifica una proteína de elección se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta a una célula hospedante adecuada y se cultiva bajo condiciones adecuadas para expresión como se describe a continuación en la presente invención. Se prefieren especialmente los métodos recombinantes para producir polipéptidos más largos.

Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vectores de expresión/hospedantes para contener y expresar la secuencia codificante del péptido o la proteína. Estos incluyen, entre otros, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN plásmidos o cósmidos, bacteriófago recombinante; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión vírica (p. ej., baculovirus); sistemas de células vegetales transfectadas con vectores de expresión vírica (p. ej., virus mosaico de la coliflor, CaMV; virus mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión bacteriana (p. ej., plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células animales, incluidos sistemas de células mamíferas. Los expertos en la técnica conocen las distintas técnicas para optimizar la expresión mamífera de proteínas. Las células mamíferas útiles en producciones de proteínas recombinantes incluyen, aunque sin limitarse a ello, células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), células COS (como COS-7), W138, BHK, HepG2, Caco-2, HT29, HEK, HCT 116, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y células 293.

Los protocolos ilustrativos para la expresión recombinante de los sustratos peptídicos o los polipéptidos de fusión en bacterias, levadura y otros invertebrados se conocen en la técnica y se describen brevemente a continuación.

En la producción recombinante del polipéptido de la invención sería necesario emplear vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido. Los métodos para preparar dichos vectores así como también para producir células hospedantes transformadas con dichos vectores se conocen en la técnica. Las moléculas polinucleotídicas utilizadas en dicho empeño se pueden unir a un vector, que en general incluye un marcador seleccionable y un origen de replicación, para propagación de un hospedante. El experto en la técnica conoce estos elementos de los constructos de expresión. En general, los vectores de expresión incluyen ADN que codifica la proteína determinada que está siendo operativamente unida a secuencias reguladoras de transcripción o traducción adecuadas, como aquellas derivadas del gen de un insecto, mamífero, microbio o virus. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores de transcripción, operadores o potenciadores, sitios de unión al ribosoma del ARNm y secuencias adecuadas que controlan la transcripción y la traducción.

La elección de un vector de expresión adecuado para expresión del polipéptido de la invención dependerá por supuesto de la célula hospedante específica que se ha de utilizar, y está dentro de la experiencia del experto en la materia.

La expresión requiere que las señales adecuadas sean provistas en los vectores, como potenciadores/promotores de fuentes víricas y mamíferas que se pueden utilizar para promover la expresión de los ácidos nucleicos de interés en las células hospedantes. Usualmente, el ácido nucleico que se está expresando está bajo el control de transcripción de un promotor. Un "promotor" hace referencia a una secuencia de ADN que es reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. Las secuencias nucleotídicas se unen operativamente cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés (es decir, un polipéptido de la invención, su derivado o su fragmento y similares). Por consiguiente, una secuencia de nucleótidos promotora está operativamente unida a una secuencia de ADN determinada si la secuencia de nucleótidos promotora dirige la transcripción de la secuencia.

De modo similar, la frase "bajo control de transcripción" significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con el ácido nucleico para controlar el inicio de la ARN polimerasa y la expresión del gen. Se puede usar cualquier promotor que promueva la expresión del ácido nucleico. Se cree que el promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés no es importante, siempre y cuando sea capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico en la célula seleccionada. Por lo tanto, si se selecciona una célula humana, es preferible posicionar la región que codifica el ácido nucleico adyacente y bajo el control de un promotor capaz de expresarse en una célula humana. En términos generales, dicho promotor podría incluir o bien un promotor humano o vírico. Los promotores comunes incluyen, p. ej., el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano SV40, la repetición terminal larga del Rous sarcoma virus, [beta]-actina, promotor de insulina de rata, el promotor de fosfoglicerol cinasa y el promotor gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, todos promotores conocidos y fácilmente disponibles para el experto en la técnica, se pueden utilizar para obtener un alto nivel de expresión de la secuencia codificante de interés. El uso de otros promotores de fagos celulares o bacterianos, víricos o mamíferos, conocidos en la técnica para lograr la expresión de una secuencia codificante de interés se contempla también, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para producir un rendimiento recuperable de la proteína de interés. Al emplear un promotor con propiedades conocidas, el nivel y el patrón de expresión de la proteína de interés después de la transfección o transformación se puede optimizar. Los promotores inducibles también se pueden utilizar.

Otro elemento regulador que se usa en la expresión de proteínas es un potenciador. Estos elementos genéticos aumentan la transcripción de un promotor ubicado en una posición distante en la misma molécula de ácido nucleico. Si un constructo de expresión emplea una inserción de ADNc, se desearía típicamente incluir una secuencia de señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilazción correcta del transcripto del gen. Cualquier secuencia de señal de poliadenilación reconocida por las células de la especie animal transgénica seleccionada es adecuada para la práctica de la invención, como la hormona del crecimiento humano o bovino y las señales de poliadenilación SV40.

La proteína identificada por los inventores parece comprender sitios de glucosilación. Por ende, los sistemas hospedantes preferiblemente utilizados son capaces de glucosilar el polipéptido de la invención. Los expertos en la técnica tienen la capacidad de elegir dichos sistemas. Los ejemplos de células hospedantes que se utilizan comprenden, entre otros, células *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus rhamnosus.*

Ácidos nucleicos, vectores y células hospedantes de la invención

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

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

En una realización preferida de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

En otra realización particular, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria que resulta de una activación de la vía de NFκB.

Tal como se emplea en la presente memoria, dicha secuencia de ácido nucleico puede ser una secuencia de ADN o ARN.

En una realización particular de la invención, dicha secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende o que consiste en las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO:2-7 y SEQ ID NO:8-18.

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

En una realización más preferida de la invención, dicha secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico definida por la SEQ ID NO:19.

SEQ ID NO:19	ATG ATG ATG CCT GCA AAC TAC TCT GTT ATC GCA GAG AAC GAA ATG ACC TAC GTC AAC GGT GGC GCT AAC TTC ATC GAC GCT ATC GGC GCT GTT ACC GCT CCT ATC TGG ACT CTG GAC AAC GTT AAG ACC TTC AAC ACC AAC ATC GTG ACT CTG GTT GGC AAC ACC TTC CTG CAG TCC ACC ATT AAC CGC ACC ATC GGT GTC CTG TTC AGC GGC AAC ACC ACC TGG AAG GAA GTC GGC AAC ATC GGC AAG AAC CTG TTC GGC ACC AAT GTT AAG GGC AAC CCG ATC GAG AAG AAC AAC TTT GGT GAC TAT GCT ATG AAC GCT CTG GGC ATT GCT GCT GCT GTC TAC AAC CTG GGC GTG GCT CCC ACC AAG AAC ACC GTC AAG GAG ACT GAG GTT AAG TTC ACT GTC TAA

Tal como se emplea en la presente memoria, dicha secuencia de ácido nucleico abarca sus derivados o fragmentos. Preferiblemente, dichos derivados o fragmentos son derivados o fragmentos conservadores.

En una realización preferida, se aísla dicha secuencia de ácido nucleico, su derivado o su fragmento.

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

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

En una realización preferida de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

En otra realización particular, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria que resulta de la activación de la vía de NFκB.

El término "vector" (o "vector de clonación" y "vector de expresión") significa el vehículo mediante el cual una secuencia de ácido nucleico puede introducirse en una célula hospedante, como para transformar el hospedante y promover la expresión (p. ej., transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

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

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

De acuerdo con la invención, se puede usar cualquier vector de expresión para células animales, siempre y cuando pueda insertarse y expresarse la secuencia de ácido nucleico de la invención. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSG1 beta d2-4 y similares.

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

Otros ejemplos de vector vírico incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, herpes virus y AAV. Dichos virus recombinantes se pueden producir por técnicas conocidas en la industria, como transfección de células empaquetadoras o transfección transitoria con plásmidos o virus cooperadores. Los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes defectuosos de replicación se pueden hallar, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO94/19478.

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

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

En una realización preferida de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es enfermedad de Crohn.

En otra realización particular, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria que resulta de la activación de la vía de NFκB.

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

Los ejemplos de células hospedantes que se pueden usar para la invención se conocen en la técnica, y algunos de ellos se describieron en lo precedente.

La proteína identificada por los inventores parece comprender sitios de glucosilación. Por consiguiente, las células hospedantes utilizadas preferiblemente son capaces de glucosilar el polipéptido de la invención. Los expertos en la técnica pueden escoger dichos sistemas. Los ejemplos de células hospedantes que se pueden utilizar comprenden, entre otros, células de *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus rhamnosus.*

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

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

Los ejemplos de células hospedantes que se pueden utilizar comprenden, entre otros, *Bacillus coagulans, Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus reuteri Protectis, Saccharomyces boulardii, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophiles, Lactobacillus bifidus.*

Los vectores y células hospedantes de la invención se adaptan a una administración en pacientes, preferiblemente seres humanos. El experto en la técnica puede escoger fácilmente dichos vectores y células hospedantes.

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

De acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico, vector y célula hospedante de la invención se pueden utilizar para producir un polipéptido recombinante de la invención en un sistema de expresión adecuado.

Composiciones farmacéuticas de la invención

Un quinto objeto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de la invención, una secuencia de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula hospedante de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

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

En una realización preferida de la invención, dicha enfermedad inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

En otra realización particular, dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria que resulta de una activación de la vía de NFκB.

El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial a un mamífero, especialmente un ser humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable hace referencia a una carga no tóxica sólida, semisólida o líquida, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

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

En general, el polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención se administrará como formulaciones farmacéuticas que incluyen aquellas adecuadas para administración oral (incluida bucal y sub-lingual), rectal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal o parenteral (incluida intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea e intravenosa) o en forma adecuada para administración por inhalación o insuflación. El modo de administración preferido es en general oral, usando un esquema de administración diaria conveniente que se puede ajustar según el grado de dolencia.

Un polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención, junto con uno o más adyuvantes convencionales, vehículos o diluyentes, se puede disponer en la forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias. Las composiciones farmacéuticas y dosis unitarias pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y las formas de dosis unitarias pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del ingrediente activo acorde al intervalo de dosis que se tenga como fin emplear. Las composiciones farmacéuticas se pueden emplear como sólidos, tal como comprimidos o cápsulas rellenas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, o líquidos tales como disoluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, o cápsulas rellenas para uso oral; o en la forma de supositorios para administración rectal o vaginal; o en la forma de disoluciones inyectables estériles para uso parenteral. Las formulaciones que contienen aproximadamente un (1) miligramo de ingrediente activo o, más ampliamente, aproximadamente 0,01 a aproximadamente cien (100) miligramos, por comprimido, son por consiguiente formas de presentación unitarias representativas adecuadas.

El polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención se puede formular en una amplia variedad de presentaciones para administración oral. Las composiciones farmacéuticas y las presentaciones pueden comprender un polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención o sus sales farmacéuticamente aceptables como componente activo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, pastillas, cápsulas, obleas, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también actúan como diluyentes, saporíferos, solubilizantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes desintegrantes de comprimidos o un material de encapsulación. En polvos, el vehículo en general es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finalmente dividido. En comprimidos, el componente activo en general se mezcla con el vehículo que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y el tamaño deseados. Los polvos y comprimidos preferiblemente contienen entre aproximadamente uno (1) y aproximadamente setenta (70) por ciento del compuesto activo. Los vehículos adecuados incluyen, entre otros, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de baja fusión, mantequilla de cacao y similares. El término "preparación" está destinado a incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como vehículo, proporcionando una cápsula en la que el componente activo, con o sin vehículos, está rodeado por un vehículo, que está asociado a este. De forma similar, se incluyen obleas y grageas. Los comprimidos, polvos, cápsulas, pastillas, obleas y grageas pueden estar en formas sólidas adecuadas para administración oral.

Otras formas adecuadas para administración oral incluyen preparaciones en forma líquida que incluyen emulsiones, jarabes, elixires, disoluciones acuosas, suspensiones acuosas, o preparaciones en forma sólida destinadas a convertirse poco antes del uso en preparaciones en forma líquida. Se pueden preparar emulsiones en disoluciones, por ejemplo, en disoluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina sorbitán monooleato o goma arábiga. Las disoluciones acuosas se pueden preparar disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes adecuados, saporíferos, estabilizantes y espesantes.

Las suspensiones acuosas se pueden preparar dispersando el componente activo finalmente dividido en agua con material viscoso, como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros agentes de suspensión conocidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen disoluciones, suspensiones y

emulsiones, y pueden contener, además del componente activo, colorantes, saporíferos, estabilizantes, tampones y edulcorantes naturales y artificiales, dispersantes, espesantes, solubilizantes y similares.

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

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en la forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización de la disolución para constitución antes del uso con un vehículo adecuado, p. ej., agua apirógena estéril.

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

El polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención se puede formular para administración como supositorios. Una cera de baja fundición, como una mezcla de glicéridos de ácido graso y mantequilla de cacao se funde primero, y el componente activo se dispersa en forma homogénea, por ejemplo, agitando. La mezcla homogénea fundida se vierte luego en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y solidificar.

El polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención se puede formular para administración vaginal.

Los óvulos, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen, además del ingrediente activo, dichos vehículos se conocen en la técnica como adecuados.

El polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención se puede formular para administración nasal. Las disoluciones o suspensiones se aplican directamente a la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo, con un gotero, pipeta o pulverizador. Las formulaciones se pueden proporcionar en una forma de dosis individual o de múltiples dosis. En el último caso de un gotero o pipeta, esto se puede lograr administrando al paciente un volumen predeterminado adecuado de la disolución o suspensión. En el caso de un aerosol, esto se puede lograr por ejemplo mediante una bomba de atomización dosificada.

El polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención se puede formular para administración en aerosol, particularmente a las vías respiratorias, incluida la administración intranasal. El compuesto en general tendrá un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo, en el orden de cinco (5) micrómetros o menos.

Dicho tamaño de partícula se puede obtener por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo micronización. El ingrediente activo se provee en un envase presurizado con un propulsor adecuado tal como clorofluorocarbono (CFC), por ejemplo, diclorofluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, nitrógeno, óxido nitroso, dióxido de carbono y otro gas adecuado. El aerosol puede además contener convenientemente un tensioactivo tal como lecitina. La dosis de fármaco se puede controlar con una válvula dosificada. Alternativamente, los ingredientes activos se pueden proporcionar en la forma de polvo seco, por ejemplo una mezcla de polvo del compuesto en una base de polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetil celulosa y polivinilpirrolidina (PVP). El vehículo de polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición del polvo se puede presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos de, p. ej., gelatina o envases ampolla desde los cuales se puede administrar el polvo mediante un inhalador.

Si se desea, las formulaciones se pueden preparar con recubrimientos entéricos adaptados para liberación sostenida o controlada del ingrediente activo. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden formular en dispositivos para administración transdérmica o subcutánea de fármacos. Estos sistemas de

administración son ventajosos cuando es necesaria la liberación sostenida de los compuestos y cuando es crucial el cumplimiento del paciente con el esquema de tratamiento. Los compuestos en los sistemas de administración transdérmica frecuentemente se adhieren a un soporte adhesivo en la piel.

Otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas para liberación prolongada; y cualquier otra forma actualmente utilizada. Las cápsulas no degradables, o las cápsulas gastro-resistentes también se pueden utilizar. Dichas formas farmacéuticas se conocen en la técnica.

En determinadas realizaciones, el uso de liposomas y/o nanopartículas se contempla para la administración del polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención. Los liposomas son particularmente adecuados para la administración oral de un compuesto hidrófobo. La formación y el uso de liposomas y/o nanopartículas se conocen en la técnica.

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

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

En general, el polipéptido, secuencia de ácido nucleico, vector o célula hospedante de la presente invención se administrará en una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los modos aceptados de administración para agentes que cumplen funciones similares. Los intervalos de dosis adecuados son típicamente aproximadamente 1-500 mg diarios, preferiblemente aproximadamente 1-100 mg diarios, y lo más preferiblemente aproximadamente 1-30 mg diarios, dependiendo de numerosos factores tales como la gravedad de la enfermedad que se ha de tratar, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto utilizado, la ruta y forma de administración, la indicación a la cual se dirige la administración, y las preferencias y experiencia del médico involucrado. El experto en la técnica de tratamiento de dichas enfermedades será capaz, sin experimentación indebida y confiando en su conocimiento personal y en la descripción de la presente solicitud, de determinar la cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención para una enfermedad determinada.

Las preparaciones farmacéuticas son preferiblemente formas farmacéuticas unitarias. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma farmacéutica unitaria puede ser una preparación envasada, en donde el envase contiene cantidades discretas de la preparación, como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Además, la forma farmacéutica unitaria puede ser una cápsula, comprimidos, obleas o pastillas propiamente dicha, o puede ser un número adecuado de cualquiera de estas formas envasadas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferidos para elaborar y poner en práctica la presente invención. No obstante, se ha de entender que los ejemplos tienen fines ilustrativos solamente y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1. Identificación de la molécula(s) responsable del efecto antiinflamatorio de *Faecalibacterium prausnitzii*

1. Identificación de seis péptidos solamente presentes en el sobrenadante de *F. prausnitzii.*

Además del conocimiento de SOKOL et al., PNAS, 2008, los presentes inventores trataron de identificar primero las moléculas responsables del efecto antiinflamatorio de *Faecalibacterium prausnitzii.* No obstante, esta determinación fue claramente impredecible debido a la dificultad de cultivar *F. prausnitzii,* un microorganismo estrictamente anaerobio. Asimismo, puesto que la caracterización de este microorganismo es muy reciente, sus características, especificidades, taxonomía, etc. son esencialmente desconocidas, lo cual complica su uso como modelo experimental.

1.1. Cultivo de *F. prausnitzii*

El cultivo de F. prausnitzii fue difícil, en parte debido a la sensibilidad de la bacteria y a la necesidad de condiciones anaerobias.

1.2. Fraccionamiento del medio de cultivo de *F. prausnitzii*

Se llevó a cabo una extracción sólido/líquido de 3 ml de medio en cartuchos Waters Oasis HLB® SPE para fraccionar el sobrenadante de cultivo. Se obtuvieron seis fracciones eluyendo con 20%, 30%, 45%, 60%, 90% y 100% de acetonitrilo. Estas fracciones se secaron usando un speed-vac, luego se extrajeron con DMEM. Las

pruebas en células Caco-2 estimuladas con IL-1 demostraron un efecto antiinflamatorio para una fracción del sobrenadante que se eluyó con 90% acetonitrilo.

1.3. Análisis comparativo de espectrometría de masas del medio de cultivo de *F. prausnitzii*

Se analizaron luego las fracciones "activas" eluidas con 90% de acetonitrilo para detectar moléculas específicas del sobrenadante de cultivo de *F. prausnitzii.* Se obtuvieron los espectros de masas MALDI-TOF de LyBHI y sobrenadante de cultivo a partir de Voyager® DE Pro (AB-Sciex) en el modo positivo de reflector y lineal, usando un láser UV de nitrógeno (337 nm, láser 3 Hz, pulso 3 ns) y una matriz de 100 mM ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) en 70/30% (v/v) disolución de acetonitrilo/agua disolución en TFA al 0,1%. Se obtuvieron los espectros con una demora de extracción de 125 ns (para el modo de reflector) o 300 ns (para el modo lineal), un voltaje de aceleración de 20 kV y un promedio de 300 disparos láser por muestra. El intervalo de masas estudiado oscila entre 500 y 4000 Da para el modo reflector y entre 3500 y 30 000 Da para el modo lineal.

Se identificaron seis iones (m/z 1733.93 ; 1832.92; 1946.97; 2047.95, 2146.94 y 4601.06) en la fracción del sobrenadante de *F. prausnitzii* eluida con 90% de acetonitrilo. No se observó ninguna diferencia entre el medio de cultivo LyBHI y el sobrenadante de *F. prausnitzii* en las otras fracciones del medio.

1.4. Identificación de moléculas con un espectrómetro de masas FT-ICR

Se fragmentaron los iones de interés con un espectrómetro de masas FT-ICR, equipado con un imán superconductor 7T (Apex Qe®, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Los datos espectrales de masas se adquirieron en el modo de banda ancha en un intervalo de *m*/*z* de 150 a 1500 con 256 k puntos de datos, conduciendo al registro de una señal transitoria de 0,17 s. El procesamiento de los datos y la adquisición de los datos se realizaron usando respectivamente el software Apex Control® versión 2.1 y Data Analysis® versión 3.4 (Bruker Daltonics). Los valores de masas exhibidos corresponden a las masas monoisotópicas. Los espectros de masas obtenidos para estos seis iones corresponden a los espectros de péptidos de fragmentación. Por consiguiente, fue necesaria una secuenciación *de novo* de los seis péptidos para obtener una secuencia de aminoácidos.

1.5. Secuenciación de novo de los seis péptidos.

Las fracciones liofilizadas se resuspendieron en una mezcla de metanol/agua que contenía ácido fórmico al 0,5% y se infundieron directamente en el espectrómetro de masas híbrido Qh-FT/ICR. Los espectros de masas se registraron en modo de ionización positiva. La energía cinética fue 4 eV para el registro de un espectro de masas y aproximadamente 15 eV para un espectro de iones de producto. El tiempo de acumulación de iones en la celda de colisión, actuando como una trampa lineal, fue 0,5 s. El tiempo de transferencia de los iones entre la celda de colisión y la celda ICR se configuró en 0,001 seg. Los iones fueron atrapados en la celda ICR por un potencial de atrapamiento de 2V, y este potencial se redujo a 1 V para la etapa de excitación/detección.

A continuación se presentan las secuencias de aminoácidos obtenidas por secuenciación *de novo*:

Péptido 1	GNTF[I/L]QST[I/L]NRT[I/L]GV[I/L]
Péptido 2	VGNTF[I/L]QST[I/L]NRT[I/L]GV[I/L]
Péptido 3	[I/L]VGNTF[I/L]QST[I/L]NRT[I/L]GV[I/L]
Péptido 4	T[I/L]VGNTF[I/L]QST[I/L]NRT[I/L]GV[I/L]
Péptido 5	VT[I/L]VGNTF[I/L]QST[I/L]NRT[I/L]GV[I/L]
Péptido 6	FSGNTTWKEVGNIGKNLFGTNVKGNPIEKNNFGDYAMNALGIA

El Péptido 1 corresponde al péptido definido por la secuencia SEQ ID NO:11 anteriormente descrita, el péptido 2 corresponde al péptido definido por la secuencia SEQ ID NO:12 anteriormente descrita, el péptido 3 corresponde al péptido definido por la secuencia SEQ ID NO:13 anteriormente descrita, el péptido 4 corresponde al péptido definido por la secuencia SEQ ID NO:14 anteriormente descrita, el péptido 5 corresponde al péptido definido por la secuencia SEQ ID NO:15 anteriormente descrita, el péptido 6 corresponde al péptido definido por la secuencia SEQ ID NO:10 anteriormente descrita.

La identificación de residuos leucina e isoleucina estuvo inicialmente indefinida debido a que son aminoácidos isoméricos, y el genoma *de F. prausnitzii* no se secuenció.

I.5. Análisis *in silico* de los seis péptidos

Ni bien se secuenció el genoma de *F.prausnitzii*, el análisis *in silico* (NCBInr) permitió confirmar que estos seis péptidos derivan todos de una proteína de *F. prausnitzii* A2-165, ZP 05614546.1 (número de acceso modificado a WP_005932151; SEQ ID NO:2) proteína hipotética conservada (valor E: 10^{-9}) y eliminar la ambigüedad entre leucina e isoleucina.

Este análisis también posibilitó detectar a posteriori otros tres péptidos provenientes de esta proteína ZP 05614546.1 (número de acceso modificado a WP_005932151; SEQ ID NO:2) en esta fracción activa, con una muy baja intensidad en los espectros de MS.

Péptido 7	NTFLQSTINRTIGVL
Péptido 8	AAVYNLGVAPTKNTVKETEVKFTV
Péptido 9	NYSVIAENEMTYVNGGANFIDAIGAVTAPIWTLDNVKTFNTNIVT LV

El Péptido 7 corresponde al péptido definido por la secuencia SEQ ID NO:16 anteriormente descrita, el péptido 8 corresponde al péptido definido por la secuencia SEQ ID NO:17 anteriormente descrita, el péptido 9 corresponde al péptido definido por la secuencia SEQ ID NO:18 anteriormente descrita.

En esta primera parte, los inventores identificaron nueve péptidos que fueron detectados solamente en el sobrenadante de *F. prausnitzii.* Estos péptidos estuvieron presentes en la fracción activa eluida del sobrenadante de *F. prausnitzii,* y ausentes de las fracciones control, sin efecto inflamatorio.

Los inventores identificaron entonces péptidos anti-inflamatorios, todos provenientes de una proteína (ZP 05614546.1, número de acceso modificado a WP_005932151; SEQ ID NO:2) de 14 491.350 Da sintetizada por *F. prausnitzii.* Se desconoce la función de esta proteína.

2. Evaluación de los efectos antiinflamatorios de la proteína ZP05614546.1 (número de acceso modificado a WP_005932151; SEQ ID NO:2) y sus péptidos derivados

Con el fin de confirmar que los efectos antiinflamatorios del sobrenadante de *F. prausnitzii* dependen por lo menos en parte de ZP05614546.1 y/o sus péptidos derivados, los inventores ensayaron los péptidos derivados de proteínas sintéticas y la proteína ZP05614546.1 propiamente dicha usando dos planteamientos.

2.1. Caracterización de la proteína

Los inventores estudiaron las diferentes propiedades de la proteína.

Primero, identificaron por alineación en bases de datos biológicas cinco secuencias ortólogas que tienen una identidad significativa con la secuencia de ZP05614546.1. Dichas secuencias parecen pertenecer a otras cepas de *F. prausnitzii.* Estas secuencias pueden ciertamente corresponder a ortólogos de la proteína ZP05614546.1 (Figura 3). Se obtuvo una secuencia de consenso a partir de esta alineación correspondiente a la SEQ ID NO:1.

Cabe destacar que observaron que la parte N-terminal de la proteína (aproximadamente los primeros 80 aminoácidos; SEQ ID NO: 8) está altamente conservada. Una parte central de la proteína también demuestra una conservación significativa para aproximadamente 20 aminoácidos alrededor de 150 aminoácidos.

Estudiando la estructura hipotética de la proteína, demuestran que contienen dos dominios hidrófobos alrededor de la posición AA20-50 y la posición AA90-120. Estos segundos dominios hidrófobos corresponden al dominio 20aa significativamente conservado alrededor de los 150 aminoácidos. Otro análisis estructural de la secuencia demuestra dos regiones α-helicoidales hipotéticas que coinciden con estos dos dominios hidrófobos.

En función de estos análisis, la estructura central del polipéptido de la invención corresponde a una secuencia de aminoácidos que tiene, en la orientación del término N al término C:

- la secuencia de consenso SEQ ID NO:8; y
- la secuencia de consenso SEQ ID NO:9,

en donde la secuencia SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9 están preferiblemente espaciadas entre 80 y 10 aminoácidos, preferiblemente entre 60 y 15 aminoácidos, y más preferiblemente entre 40 y 20 aminoácidos.

Cabe destacar que el estudio de la secuencia y la estructura de la proteína parece demostrar que no contienen ningún péptido de señalización. Algunos de los fragmentos identificados por los inventores (como se describió anteriormente) corresponden a fragmentos de las regiones conservadas dentro de las cinco secuencias "ortólogas".

2.2. Incubación directa de modelos de células epiteliales intestinales con la proteína ZP05614546.1 y los péptidos derivados de interés

Los inventores incubaron por lo tanto células epiteliales HT29 con la proteína y/o con los péptidos derivados anteriormente descritos.

Usando dichas células, no obtuvieron ningún resultado que pudiera demostrar algún efecto antiinflamatorio con el uso de esta estrategia.

Los inventores incubaron luego células epiteliales intestinales segregadoras de moco HT29-MTX con dos fragmentos de péptidos obtenidos de la proteína ZP05614546.1.

SEQ ID NO:20	KGNTFLQSTINRTIGVL
SEQ ID NO:21	VKGNPIEKNNFGDYAMNALGIAAAVYNLGVAPTK NTVKETEVKFTV

Ambos péptidos definidos por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:21 respectivamente corresponden a las regiones entre las posiciones 53 y 68 y 90 y 135 de la proteína ZP05614546.1

Los inventores midieron la producción de IL-8 (como marcador de inflamación) después de la estimulación de las células HT29-MTX incubadas o no con dichos péptidos y estimuladas por TNFα. Los resultados demuestran que estos péptidos tienen un efecto antiinflamatorio en un modo dependiente de la dosis (figura 4).

Esta actividad biológica observada con los péptidos en el modelo de células HT29-MTX puede resultar de una interacción entre los polipéptidos de la invención y el moco.

2.3. Transfección de la proteína ZP05614546.1 en modelos de células epiteliales

Con el fin de analizar más la actividad de los polipéptidos de la invención, los inventores decidieron transfectar el ADNc que codifica la proteína directamente en el modelo de células epiteliales mamíferas.

La secuencia de la proteína ZP05614546.1 se ha clonado en el vector pCMV, 3xFlag (término C).

Usando un sistema indicador de NFκB en células epiteliales humanas HEK 293T, demostraron que la proteína ZP05614546.1 inhibe la vía de señalización de NFκB en un modo dependiente de la dosis.

De hecho, la proteína ZP05614546.1 inhibe la activación de NFkB dependiente de Carma-1 (Figura 1).

En células HEK293T que expresan de manera estable TLR4, MD2 y CD14, los inventores demostraron además que la proteína ZP05614546.1 inhibe la activación de NFκB dependiente de LPS (Figura 2).

La expresión de ZP05614546.1 se confirmó en células HEK293T por inmunotransferencia Western blot con anticuerpo anti-Flag. En otro modelo de células (HeLa), la expresión se validó por inmunofluorescencia y se localizó ZP05614546.1 alrededor del núcleo celular.

En conclusión, los inventores demostraron que, incluso si los primeros resultados parecen demostrar lo contrario, la proteína ZP05614546.1 y sus péptidos derivados anteriormente descritos tienen efecto antiinflamatorio.

Ejemplo 2. Uso de efectos antiinflamatorios de la proteína de la invención

Construcciones

La forma segregada de la proteína ZP05614546.1 se expresó en el sistema hospedante NICE (expresión controlada inducida por nisina) (cepa *L. lactis* NZ9000), usando un cassette de expresión pSEC en donde el gen que codifica

ZP05614546.1 se clona en dirección 3' al promotor pNis y un péptido de señalización Usp45. El plásmido aloja un gen de resistencia a cloranfenicol.

El gen que codifica ZP05614546.1 se produce por síntesis con el fin de optimizar los codones para *L. lactis* para una mejor expresión de la proteína en esta célula hospedante. El gen es digerido por enzimas de restricción compatibles con aquellas que digieren el vector pSEC (NsiI, SpeI). La ligadura entre el vector y el inserto genera un plásmido que se introduce en la cepa NZ9000 por electroporación.

Los clones que se desarrollan en un medio que comprende medio M17 + glucosa 0,5% + Cloranfenicol 10 µg/ml se analizan para detectar la presencia del inserto que codifica la proteína ZP05614546.1. El plásmido purificado que comprende el inserto se secuencia con el fin de confirmar la integridad de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés en dicho plásmido. Después de confirmar su secuencia, el plásmido se transfiere a las cepas NZ9000 (Htra-), NZ9000 (Clp-) y NZ9000 (Htra-/Clp-).

Las cepas que contienen el plásmido que codifica la proteína ZP05614546.1 se reintroducen en un medio que comprende M17 + glucosa 0,5% + Cloranfenicol 10 µg/ml y se incuban durante la noche a 30°C. A la mañana siguiente, la cepa se diluye a 1/100. La expresión de la proteína se induce con nisina a 10 ng/ml durante una hora a 30°C. Se lleva a cabo la extracción de proteína separando el centrifugado y el sobrenadante, y tratándolos de manera diferente. Las proteínas presentes en el sobrenadante precipitan con TCA y se centrifugan durante 30 min, y luego se introducen en tampón Laemmli. El centrifugado se mezcla en PBS que comprende antiproteasa y se sonica en un ciclo de a 6*10 seg. El lisado se centrifuga con el fin de eliminar los fragmentos de bacteria, y el sobrenadante que contiene muchas proteínas se conserva para estudios posteriores.

La construcción se puede llevar a cabo en otro plásmido (un plásmido optimizado similar al anterior) que permite una mejor segregación de la proteína de interés: la presencia de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de 9 aminoácidos (LEISSTCD, SEQ ID NO:22) dispuesta entre la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de señalización y la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés añade dos cargas negativas a la proteína, lo que permite un mejor transporte a través de la membrana bacteriana.

La clonación se realiza por introducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés en dicho plásmido como se describió anteriormente. Dicho plásmido se introduce en la cepa NZ9000 WT y en la cepa NZ9000 Htra (deficiente en su proteasa externa).

Se contempla otra construcción que permite una forma citoplásmica de la proteína de interés. Consiste en la fusión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés con el promotor pNis sin el péptido de señalización Usp45. La forma citoplásmica de dicha proteína permite la protección de la proteína en condiciones externas duras.

La clonación y la expresión de la proteína se realizan como se describió precedentemente. El sobrenadante de las bacterias que expresa las proteínas no se analiza, ya que la proteína ya no es segregada.

Estudios *in vitro* de los efectos antiinflamatorios de la proteína y sus fragmentos derivados

Se disponen células epiteliales HT29 en un medio DMEM que comprende 10% suero SVF y 1% glutamina en una concentración de 0,1 10^6 células/ml. Las células se disponen en placas de 24 pocillos (500 µl de medio por pocillo). Las placas se colocan a 37°C en una sala de esterilización con 10% CO_2 durante 72 horas.

Se cambia el medio de cultivo 3 veces, y las células se incuban durante 24 horas cada vez. Luego las células se estresan en un medio de DMEM que comprende 5% suero SVF y se añade 1% glutamina (500 µl por pocillo). Las placas se colocan a 37°C en una sala de esterilización con 10% CO_2 durante 24 horas.

Luego las células HT29 se co-incuban con bacterias que expresan la proteína ZP05614546.1 (en una relación 1/40) y se recuperan los sobrenadantes.

El medio comprende DMEM, 5% suero SFV, 1% glutamina, con o sin TNFα en una concentración de 5 ng/µl, con o sin antibióticos PS 0,1%.

Los cultivos bacterianos se centrifugan a 3000 g durante 5 min, los centrifugados se recuperan en 1 ml de DMEM y se centrifugan nuevamente a 3000 g durante 5 min. Los centrifugados se recuperan en 1 ml de DMEM + 5% suero SVF + 1% glutamina.

Se elimina el DMEM, se añaden 450 µl/pocillo de medio que comprende DMEM + 5% suero SVF + 1% glutamina + 0,1% PS o DMEM + 5% suero SVF +1% glutamina +0,1% PS + TNFα. 50 µl de disolución bacteriana. El control no comprende disolución bacteriana.

Las placas se disponen en una sala de esterilización con CO_2 a 37°C durante 6 horas.

Los sobrenadantes de los cultivos se recuperan y reservan.

Estudios *in vivo* de los efectos antiinflamatorios de la proteína y sus fragmentos derivados.

Se mantienen ratones C57B16 (6-8 semanas de vida) a temperatura ambiente bajo ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y con libre acceso a alimento y agua, excepto el día antes de la inducción de colitis, en donde se los mantiene en ayunas durante 12 horas.

Se induce inflamación colónica con tratamientos de dextrano sulfato sódico (DSS). En detalle, se disuelve DSS en agua potable (3 o 5% en peso/vol) y los animales tienen libre acceso a beber esta disolución durante 7 días. El consumo de agua se mide en los grupos tratados con DSS y se compara con los grupos de ratones que reciben agua sin DSS: no se observa ninguna diferencia en el volumen de líquido consumido, entre los ratones que reciben agua y los que reciben DSS. Los ratones son tratados a diario por vía oral con 200 µl de 1 a $5{,}10^{9}$ unidades formadoras de colonias (cfu) de las cepas que se han de ensayar o medio bacteriano solo –es decir, *L. lactis* que expresa la proteína ZP 05614546.1 (número de acceso modificado a WP_005932151) o no. El primer tratamiento comienza a la vez que se añade DSS al agua potable (pero también se puede llevar a cabo con anticipación, como tratamiento preventivo) y el último tratamiento tiene lugar el día en que se sacrifica a los animales (día 7). Se miden el peso corporal y el índice de supervivencia todos los días después de la inducción de colitis (o justo después del primer gavage, en caso de tratamiento preventivo). También se mide el índice de actividad de la enfermedad (DAI):

El índice de actividad de la enfermedad (Cooper HS Lab Invest 1993;69:238-49) se mide todos los días (como se expone en la tabla que sigue).

	Descripción	Puntuación
Diarrea	Normal	0
	Blanda	2
	Líquida	4
Sangre en las heces	No	0
	Poca	2
	Importante	4
Adelgazamiento	<1%	0
	1-5%	1
	5-10%	2
	10-15%	3
	>15%	4
Puntuación de actividad		Suma de las 3 puntuaciones

La figura 5 muestra la evolución del peso corporal en el modelo de inflamación de DSS para los ratones control (□) y los ratones tratados a diario con ZP 05614546.1 (△).

La figura 6 muestra la puntuación de la actividad observada en el día 3 después de la inducción de la inflamación colónica por DSS para los ratones control (□) y los ratones tratados a diario con ZP 05614546.1 (△).

El día 7 después de añadir DSS al agua potable, los ratones son sacrificados y se cosechan los cólones para medir varios parámetros de inflamación: se pueden medir el espesor y la longitud de los intestinos, la actividad de mieloperoxidasa (MPO), la expresión de citocinas (IL-17A, IFN-γ, IL10, IL12p70 u otras citocinas). Se realizan

también lavados de los cólones con 1 ml de cóctel de PBS+ anti-proteasa. Se extraen 400-500 µl de sangre para análisis de citocinas.

Las figuras 7 y 8 muestran la expresión de IL-17A e IFN-γ respectivamente para los ratones control (□) y los ratones tratados a diario con ZP 05614546.1 (△).

Finalmente, los resultados *in vivo* confirman los resultados *in vitro* anteriores, estableciendo que la proteína ZP 05614546.1 reduce significativamente la inflamación colónica.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INRA

<120> PÉPTIDOS ANTIINFLAMATORIOS

<130> INR-B-00016-PCT1

<150> EP12008611.1

< 151> 2012-12-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

< 211> 166

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Consensus sequence

<220>

< 221> x

< 222> (7)..(7)

< 223> X= Phe o Tyr

<220>

< 221> X

< 222> (8)..(8)

< 223> x= Ser o Thr

<220>

< 221> X

< 222> (9)..(9)

< 223> X= Ala o Val

<220>

< 221> X

< 222> (10)..(10)

< 223> X= val o Ile

<220>

< 221> X

< 222> (11)..(11)

< 223> X= Ser, Ala o Asn

<220>

< 221> X

< 222> (12)..(12)

< 223> X= Glu o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (13)..(13)

< 223> X= Asn o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (14)..(14)

< 223> x= Glu o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (15)..(15)

< 223> X= Met, Ser o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (16)..(16)

< 223> X= Thr o Glu

<220>
< 221> x

< 222> (17)..(17)

< 223> X= Tyr o Val

<220>
< 221> X

< 222> (19)..(19)

< 223> X= Met, Val, Asn o Tyr

<220>

< 221> X

< 222> (22)..(22)

< 223> X= Ser o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (23)..(23)

< 223> x= Asn, Asp o ningún aminoácido

<220>

< 221> X

< 222> (24)..(24)

< 223> X= Phe, Leu o ningún aminoácido

<220>
< 221> x

< 222> (25)..(25)

< 223> X= Ile, Phe o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (26)..(26)

< 223> X= Asp, Thr o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (27)..(27)

< 223> X= Ala, Ile o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (28)..(28)

< 223> x= val, Leu o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (29)..(29)

< 223> X= Ala, Val o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (30)..(30)

< 223> x= Ala o Asp

<220>
< 221> X

< 222> (31)..(31)

< 223> X= Tyr, Val o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (32)..(32)

< 223> X= Leu o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (33)..(33)

< 223> X= Ala o Pro

<220>
< 221> x

< 222> (34)..(34)

< 223> X= Pro o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (35)..(35)

< 223> X= Ala o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (36)..(36)

< 223> X= Met o Trp

<220>
< 221> X

< 222> (37)..(37)

< 223> X= Gly, Thr o Asn

<220>
< 221> X

< 222> (38)..(38)

< 223> X= Ala, Thr o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (39)..(39)

< 223> X= Ala, Asp o Glu

<220>
< 221> X

< 222> (40)..(40)

< 223> X= Gln, Asn o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (41)..(41)

< 223> X= Trp o Val

<220>
< 221> X

< 222> (42)..(42)

< 223> X= Gln o Lys

<220>
< 221> X

< 222> (43)..(43)

< 223> X= Asn, Thr, Lys o Arg

<220>
< 221> X

< 222> (44)..(44)

< 223> X= Phe o Val

<220>
< 221> X

< 222> (45)..(45)

< 223> X= His, Ser, Asn

<220>
< 221> X

< 222> (46)..(46)

< 223> X= Lys, Ala, Thr o ser

<220>
< 221> X

< 222> (48)..(48)

< 223> X= Leu, Val o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (49)..(49)

< 223> X= Ile o Val

<220>
< 221> X

< 222> (50)..(50)

< 223> X= Thr o Lys

<220>
< 221> X

< 222> (51)..(51)

< 223> X= Ile o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (52)..(52)

< 223> X= Val o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (53)..(53)

< 223> X= Gly o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (55)..(55)

< 223> X= Lys, Ser o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (56)..(56)

< 223> X= Tyr o Phe

<220>
< 221> X

< 222> (57)..(57)

< 223> X= Val, Leu, Phe o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (58)..(58)

< 223> X= Gln, Ala, Lys o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (59)..(59)

< 223> x= Gly, Lys, Ser o His

<220>
< 221> X

< 222> (60)..(60)

< 223> X= Phe, Tyr, Thr o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (61)..(61)

< 223> X= Leu, Thr, Ile o val

<220>
< 221> X

< 222> (62)..(62)

< 223> X=Asp, Asn, Ser o Lys

<220>
< 221> X

< 222> (63)..(63)

< 223> X= Asn, Asp, Arg o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (64)..(64)

< 223> X= Thr o Val

<220>
< 221> X

< 222> (65)..(65)

< 223> x= val, Leu, Ile

<220>
< 221> X

< 222> (66)..(66)

< 223> X= Gly o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (67)..(67)

< 223> X= Ala, Gln, Val o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (68)..(68)

< 223> X= Val, Met, Leu

<220>
< 221> X

< 222> (70)..(70)

< 223> x= Ser, Asp, Gly

<220>
< 221> X

< 222> (72)..(72)

< 223> X= Thr, Asn, Ser

<220>
< 221> X

< 222> (73)..(73)

< 223> x= Trp, Tyr o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (74)..(74)

< 223> x= Thr, Val o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (75)..(75)

< 223> X= Pro, Thr, Lys o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (76)..(76)

< 223> X= Gly, Trp o Asp

<220>
< 221> X

< 222> (77)..(77)

< 223> X= Asp, Lys o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (78)..(78)

< 223> x= Gly, Glu, Asp, val o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (79)..(79)

< 223> X= Leu, val, Lys o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (80)..(80)

< 223> X= Thr, Ile, Gly o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (81)..(81)

< 223> X= Gly, Asn o Phe

<220>
< 221> X

< 222> (82)..(82)

< 223> X= Phe, Tyr, Ile o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (83)..(83)

< 223> X= Gly, Ser, Glu o Asp

<220>
< 221> X

< 222> (84)..(84)

< 223> X= Gly o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (85)..(85)

< 223> x= Gln o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (86)..(86)

< 223> x= Phe o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (87)..(87)

< 223> X= Ser, Val o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (88)..(88)

< 223> X= Lys, Thr o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (89)..(89)

< 223> X= Ile, Asn o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (90)..(90)

< 223> X= Trp, Leu o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (91)..(91)

< 223> X= Lys, Asp, Glu o Asn

<220>
< 221> X

< 222> (92)..(92)

< 223> X= Asp, Lys, Asn o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (93)..(93)

< 223> X= Asn, Ala, Leu, Ser o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (94)..(94)

< 223> X= Tyr, Phe o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (95)..(95)

< 223> X= Thr, Asn, Gly o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (96)..(96)

< 223> X= Asp, Thr, Gln o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (97)..(97)

< 223> X= Asn o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (98)..(98)

< 223> x= Val o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (99)..(99)

< 223> X= Thr, Lys,Phe o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (100)..(100)

< 223> X= Gly o Asp

<220>
< 221> X

< 222> (101)..(101)

< 223> X= Glu, Tyr, Asn o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (102)..(102)

< 223> X= Ser, Gly, Pro, Trp o Tyr

<220>
< 221> X

< 222> (103)..(103)

< 223> X= Thr, Ile o Asn

<220>
< 221> X

< 222> (104)..(104)

< 223> X= Gly, Phe, Glu, Asp o Val

<220>
< 221> X

< 222> (105)..(105)

< 223> X= Ala, Gly, Lys, Asp o Asn

<220>
< 221> X

< 222> (106)..(106)

< 223> X= Gln, Gly, Asn, His o Arg

<220>
< 221> X

< 222> (107)..(107)

< 223> X= Lys, Asn, Thr o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (108)..(108)

< 223> X= Phe, Trp, Thr o Pro

<220>
< 221> X

< 222> (109)..(109)

< 223> X= Gly o Arg

<220>
< 221> X

< 222> (110)..(110)

< 223> X= Tyr, Phe, Asp, Thr o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (111)..(111)

< 223> X= Gly, Tyr, Asp, Glu o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (112)..(112)

< 223> X= Ala o Asp

<220>
< 221> X

< 222> (113)..(113)

< 223> X= Leu, Val, Met o Gln

<220>
< 221> X

< 222> (114)..(114)

< 223> X= Gly, Asn o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (115)..(115)

< 223> x= val, Ala, o Phe

<220>
< 221> X

< 222> (116)..(116)

< 223> X= Val o Leu o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (117)..(117)

< 223> X= Asn o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (118)..(118)

< 223> x= Ser, Ala, Lys o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (119)..(119)

< 223> x= Ile, Gly, val o ningún aminoácido

<220>
< 221> x

< 222> (120)..(120)

< 223> x= Leu, Met o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (121)..(121)

< 223> X= Asn, Gln, Thr o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (122)..(122)

< 223> x= val, Ile, Thr o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (123)..(123)

< 223> x= Ala, Leu o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (125)..(125)

< 223> x= Asn, Gly, Ile, Met o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (126)..(126)

< 223> X= Leu o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (127)..(127)

< 223> x= Ala o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (128)..(128)

< 223> X= Ala o val

<220>
< 221> X

< 222> (129)..(129)

< 223> X= Ile, val o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (131)..(131)

< 223> X= Asn o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (134)..(134)

< 223> X= Phe, Ser, Val, Thr o Met

<220>
< 221> X

< 222> (135)..(135)

< 223> x= Gly, Ser, Ala, Thr o Lys

<220>
< 221> X

< 222> (136)..(136)

< 223> X= Thr, Ser, Pro o Asp

<220>
< 221> X

< 222> (137)..(137)

< 223> X= Ala, Ile o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (138)..(138)

< 223> X= Lys, Gly o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (139)..(139)

< 223> X= Asn, Leu o Val

<220>
< 221> X

< 222> (140)..(140)

< 223> X= Ile, Glu, Thr, Gly o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (141)..(141)

< 223> X= Val, Thr o Phe

<220>
< 221> X

< 222> (142)..(142)

< 223> X= Gly, Lys, Asn o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (143)..(143)

< 223> X= Glu, Ser, Asp o Lys

<220>
< 221> X

< 222> (144)..(144)

< 223> X= Gly, Thr, Lys

<220>
< 221> X

< 222> (145)..(145)

< 223> X= Val, Thr o Glu

<220>
< 221> X

< 222> (146)..(146)

< 223> X= Tyr, Leu, Val o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (147)..(147)

< 223> X= Lys, Pro, Gly o Asn

<220>
< 221> X

< 222> (148)..(148)

< 223> X= Ala, Thr, Phe, Ile o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (149)..(149)

< 223> X= Leu, Thr, Asn o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (150)..(150)

< 223> X= val, Gly o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (151)..(151)

< 223> X= Lys, Gln o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (152)..(152)

< 223> x= Leu, Val o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (153)..(153)

< 223> x= Trp o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (154)..(154)

< 223> X= Gly o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (155)..(155)

< 223> X= Asp o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (156)..(156)

< 223> X= Leu o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (157)..(157)

< 223> X= Pro o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (158)..(158)

< 223> X= Asn o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (159)..(159)

< 223> X= Asn o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (160)..(160)

< 223> X= Gly o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (161)..(161)

< 223> x= Gly o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (162)..(162)

< 223> X= Ser o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (163)..(163)

< 223> X= Gly o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (164)..(164)

< 223> X= Trp o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (165)..(165)

< 223> X= Val o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (166)..(166)

< 223> x= Gly o ningún aminoácido

<400> 1

```
Met Met Met Pro Ala Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5                  10                  15

Xaa Val Xaa Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
            20                  25                  30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65                  70                  75                  80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                85                  90                  95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
            100                 105                 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
        115                 120                 125

Xaa Tyr Xaa Leu Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    130                 135                 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
145                 150                 155                 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                165
```

<210> 2

< 211> 135

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 2

```
Met Met Met Pro Ala Asn Tyr Ser Val Ile Ala Glu Asn Glu Met Thr
1               5                  10                  15

Tyr Val Asn Gly Gly Ala Asn Phe Ile Asp Ala Ile Gly Ala Val Thr
            20                  25                  30

Ala Pro Ile Trp Thr Leu Asp Asn Val Lys Thr Phe Asn Thr Asn Ile
        35                  40                  45

Val Thr Leu Val Gly Asn Thr Phe Leu Gln Ser Thr Ile Asn Arg Thr
    50                  55                  60

Ile Gly Val Leu Phe Ser Gly Asn Thr Thr Trp Lys Glu Val Gly Asn
65                  70                  75                  80

Ile Gly Lys Asn Leu Phe Gly Thr Asn Val Lys Gly Asn Pro Ile Glu
                85                  90                  95

Lys Asn Asn Phe Gly Asp Tyr Ala Met Asn Ala Leu Gly Ile Ala Ala
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Asn Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Asn Thr Val Lys Glu
        115                 120                 125

Thr Glu Val Lys Phe Thr Val
    130                 135
```

<210> 3

< 211> 143

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 3

```
Met Met Met Pro Ala Asn Phe Ser Ala Val Ser Glu Asn Glu Met Thr
1               5                  10                  15

Tyr Val Met Gly Gly Ser Val Ala Asp Tyr Leu Ala Pro Ala Met Gly
            20                  25                  30

Ala Ala Gln Trp Gln Asn Phe His Lys Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly
        35                  40                  45

Asn Lys Tyr Val Gln Gly Phe Leu Asp Asn Thr Val Gly Ala Val Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Thr Trp Thr Pro Gly Asp Gly Leu Thr Gly Phe Gly Gly Gln
65                  70                  75                  80
```

Phe Ser Lys Ile Trp Lys Asp Asn Tyr Thr Asp Asn Val Thr Gly Glu
85 90 95

Ser Thr Gly Ala Gln Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Leu Gly Val Val Asn
100 105 110

Ser Ile Leu Asn Val Ala Gly Asn Leu Ala Ala Ile Tyr Asn Leu Gly
115 120 125

Phe Gly Thr Ala Lys Asn Ile Val Gly Glu Gly Val Tyr Lys Ala
130 135 140

<210> 4

< 211> 143

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 4

Met Met Met Pro Ala Asn Phe Ser Ala Val Ser Glu Asn Glu Met Thr
1 5 10 15

Tyr Val Met Gly Gly Ser Val Ala Asp Tyr Leu Ala Pro Ala Met Gly
20 25 30

Ala Ala Gln Trp Gln Asn Phe His Lys Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly
35 40 45

Asn Lys Tyr Val Gln Gly Phe Leu Asp Asn Thr Val Gly Ala Met Phe
50 55 60

Ser Gly Thr Trp Thr Pro Gly Asp Gly Leu Thr Gly Phe Gly Gly Gln
65 70 75 80

Phe Ser Thr Ile Trp Lys Lys Asn Tyr Thr Asp Asn Val Thr Asp Glu
85 90 95

Ser Thr Gly Ala Gln Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Leu Gly Val Val Asn
100 105 110

Ser Ile Leu Asn Val Ala Gly Asn Leu Ala Ala Ile Tyr Asn Leu Gly
115 120 125

Phe Gly Thr Ala Lys Asn Ile Val Gly Glu Gly Val Tyr Lys Ala
130 135 140

<210> 5

< 211> 136

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 5

```
Met Met Met Pro Ala Asn Phe Ser Ala Val Ala Glu Asn Glu Met Thr
1               5                  10                  15

Tyr Val Val Gly Gly Ser Leu Val Asp Val Leu Ala Pro Ala Met Thr
            20                  25                  30

Thr Ala Asn Trp Gln Asn Val Ser Ala Asn Val Ile Lys Ile Val Gly
        35                  40                  45

Asn Ser Phe Leu Ala Lys Tyr Thr Asn Asp Val Leu Ala Gln Leu Phe
    50                  55                  60

Asp Gly Asn Tyr Val Pro Gly Asp Val Ile Gly Tyr Ser Val Lys Asn
65                  70                  75                  80

Leu Asp Lys Ala Tyr Asn Lys Gly Tyr Gly Thr Phe Gly Gly Asn Trp
                85                  90                  95

Gly Phe Ala Val Gly Ala Leu Asn Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Gly
            100                 105                 110

Leu Ser Ala Ile Tyr Thr Leu Gly Ser Ser Ser Ile Gly Leu Glu Thr
        115                 120                 125

Lys Ser Gly Thr Leu Pro Thr Leu
    130                 135
```

<210> 6

< 211> 142

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 6

```
Met Met Met Pro Ala Asn Phe Thr Ala Val Asn Ser Glu Val Val Tyr
1               5                  10                  15

Gly Gly Ala Asp Leu Phe Thr Ile Leu Ala Asp Thr Thr Ala Pro Ile
            20                  25                  30

Trp Asn Ala Ala Asn Val Lys Lys Phe Asn Thr Asn Leu Ile Thr Leu
        35                  40                  45

Ile Ser Asn Ser Phe Phe Lys Lys Thr Val Ser Asn Thr Leu Gly Val
    50                  55                  60

Met Phe Gly Gly Asn Trp Gly Lys Asp Gly Asp Lys Ile Phe Gly Glu
65                  70                  75                  80

Glu Gly Ser Ile Asn Gln Asn Val Phe Gly Leu Trp Asn Asp Asp His
                85                  90                  95

Thr Thr Arg Thr Asp Asp Met Thr Phe Gly Asn Lys Val Met Gln Val
            100                 105                 110

Leu Gly Met Ala Ala Val Gly Tyr Thr Leu Gly Thr Thr Asp Ala Lys
        115                 120                 125

Val Gly Phe Asn Asp Gly Val Tyr Gly Ile Asn Gly Lys Leu
    130                 135                 140
```

<210> 7

< 211> 147

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 7

```
Met Met Met Pro Ala Asn Phe Ser Ala Val Asn Ala Glu Val Val Tyr
1               5                  10                  15

Gly Gly Ala Val Ala Asp Tyr Leu Pro Ser Ala Trp Thr Ala Glu Ser
            20                  25                  30

Val Lys Arg Phe Asn Ser Asn Ile Ile Thr Leu Val Ser Asn Ser Phe
        35                  40                  45

Thr Ser His Leu Leu Lys Ala Thr Leu Gly Thr Met Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Trp Gly Ser Asp Gly Val Thr Leu Phe Gly Asp Asn Gly Thr Phe Ser
65                  70                  75                  80

Gly Leu Tyr Asn Val Asn Arg Leu Pro Gly Gly Glu Ala Gln Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Asn Lys Ile Met Thr Thr Leu Gly Leu Ala Ser Val Val Tyr Thr
            100                 105                 110

Leu Gly Met Lys Asp Ala Ala Val Leu Thr Ala Lys Lys Val Thr Asn
        115                 120                 125

Ser Asn Gly Gln Val Trp Gly Asp Leu Pro Asn Asn Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Trp Val Gly
145
```

<210> 8

< 211> 71

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> secuencia de consenso

<220>
< 221> x

< 222> (7)..(7)

< 223> X= Phe o Tyr

<220>
< 221> X

< 222> (8)..(8)

< 223> X= Ser o Thr

<220>
< 221> x

< 222> (9)..(9)

< 223> X= Ala o Val

<220>
< 221> X

< 222> (10)..(10)

< 223> X= Val o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (11)..(11)

< 223> X= Ser, Ala o Asn

<220>
< 221> X

< 222> (12)..(12)

< 223> X= Glu o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (13)..(13)

< 223> x= Asn o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (14)..(14)

< 223> X= Glu o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (15)..(15)

< 223> X= Met, Ser o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (16)..(16)

< 223> X= Thr o Glu

<220>
< 221> X

< 222> (17)..(17)

< 223> X= Tyr o val

<220>
< 221> X

< 222> (19)..(19)

< 223> X= Met, val, Asn o Tyr

<220>
< 221> X

< 222> (22)..(22)

< 223> X= Ser o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (23)..(23)

< 223> x= Asn, Asp o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (24)..(24)

< 223> X= Phe, Leu o ningún aminoácido

<220>
< 221> x

< 222> (25)..(25)

< 223> X= Ile, Phe o ningún aminoácido

<220>
< 221> x

< 222> (26)..(26)

< 223> X= Asp, Thr o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (27)..(27)

< 223> X= Ala, Ile o ningún aminoácido

<220>
< 221> X

< 222> (28)..(28)

< 223> X= val, Leu o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (29)..(29)

< 223> X= Ala, val o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (30)..(30)

< 223> X= Ala o Asp

<220>
< 221> X

< 222> (31)..(31)

< 223> X= Tyr, val o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (32)..(32)

< 223> X= Leu o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (33)..(33)

< 223> X= Ala o Pro

<220>
< 221> X

< 222> (34)..(34)

< 223> X= Pro o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (35)..(35)

< 223> X= Ala o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (36)..(36)

< 223> X= Met o Trp

<220>
< 221> X

< 222> (37)..(37)

< 223> X= Gly, Thr o Asn

<220>
< 221> X

< 222> (38)..(38)

< 223> X= Ala, Thr o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (39)..(39)

< 223> X= Ala, Asp o Glu

<220>
< 221> X

< 222> (40)..(40)

< 223> X= Gln, Asn o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (41)..(41)

< 223> X= Trp o val

<220>
< 221> X

< 222> (42)..(42)

< 223> X= Gln o Lys

<220>
< 221> X

< 222> (43)..(43)

< 223> X= Asn, Thr, Lys o Arg

<220>
< 221> X

< 222> (44)..(44)

< 223> X= Phe o val

<220>
< 221> X

< 222> (45)..(45)

< 223> X= His, Ser, Asn

<220>
< 221> X

< 222> (46)..(46)

< 223> X= Lys, Ala, Thr o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (48)..(48)

< 223> X= Leu, Val o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (49)..(49)

< 223> X= Ile o val

<220>
< 221> X

< 222> (50)..(50)

< 223> X= Thr o Lys

<220>
< 221> X

< 222> (51)..(51)

< 223> X= Ile o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (52)..(52)

< 223> X= Val o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (53)..(53)

< 223> X= Gly o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (55)..(55)

< 223> X= Lys, Ser o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (56)..(56)

< 223> X= Tyr o Phe

<220>
< 221> X

< 222> (57)..(57)

< 223> X= Val, Leu, Phe o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (58)..(58)

< 223> X= Gln, Ala, Lys o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (59)..(59)

< 223> X59= Gly, Lys, Ser o His

<220>
< 221> X

< 222> (60)..(60)

< 223> X= Phe, Tyr, Thr o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (61)..(61)

< 223> X= Leu, Thr, Ile, o Val

<220>
< 221> X

< 222> (62)..(62)

< 223> X=Asp, Asn, Ser o Lys

<220>
< 221> X

< 222> (63)..(63)

< 223> X= Asn, Asp, Arg o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (64)..(64)

< 223> X= Thr o Val

<220>
< 221> X

< 222> (65)..(65)

< 223> X= Val, Leu o Ile

<220>
< 221> X

< 222> (66)..(66)

< 223> X= Gly o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (67)..(67)

< 223> X= Ala, Gln, Val o Thr

<220>
< 221> X

< 222> (68)..(68)

< 223> X= val, Met, Leu

<220>
< 221> X

< 222> (70)..(70)

< 223> X= Ser, Asp, Gly

<400> 8

```
Met Met Met Pro Ala Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5                   10                  15

Xaa Val Xaa Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
            20                  25                  30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly
65                  70
```

<210> 9

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> secuencia de consenso

<220>
< 221> X

< 222> (2)..(2)

< 223> x= Asn, Gly, Ile, Met o Leu

<220>
< 221> X

< 222> (3)..(3)

< 223> X= Leu o Ala

<220>
< 221> X

< 222> (4)..(4)

< 223> X= Ala o Ser

<220>
< 221> X

< 222> (5)..(5)

< 223> X= Ala o val

<220>
< 221> X

< 222> (6)..(6)

< 223> X= Ile, val o Gly

<220>
< 221> X

< 222> (8)..(8)

< 223> X= Asn o Thr

<400> 9

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Leu Gly
1 5 10

<210> 10

< 211> 43

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 10

Phe Ser Gly Asn Thr Thr Trp Lys Glu Val Gly Asn Ile Gly Lys Asn
1 5 10 15

Leu Phe Gly Thr Asn Val Lys Gly Asn Pro Ile Glu Lys Asn Asn Phe
20 25 30

Gly Asp Tyr Ala Met Asn Ala Leu Gly Ile Ala
35 40

<210> 11

< 211> 16

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 11

Gly Asn Thr Phe Leu Gln Ser Thr Ile Asn Arg Thr Ile Gly Val Leu
1 5 10 15

<210> 12

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 12

Val Gly Asn Thr Phe Leu Gln Ser Thr Ile Asn Arg Thr Ile Gly Val
1 5 10 15

Leu

<210> 13

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 13

Leu Val Gly Asn Thr Phe Leu Gln Ser Thr Ile Asn Arg Thr Ile Gly

1 5 10 15

Val Leu

<210> 14

< 211> 19

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 14

Thr Leu Val Gly Asn Thr Phe Leu Gln Ser Thr Ile Asn Arg Thr Ile
1 5 10 15

Gly Val Leu

<210> 15

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 15

Val Thr Leu Val Gly Asn Thr Phe Leu Gln Ser Thr Ile Asn Arg Thr
1 5 10 15

Ile Gly Val Leu
20

<210> 16

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 16

Asn Thr Phe Leu Gln Ser Thr Ile Asn Arg Thr Ile Gly Val Leu
1 5 10 15

<210> 17

< 211> 24

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 17

Ala Ala Val Tyr Asn Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Asn Thr Val Lys
1 5 10 15

Glu Thr Glu Val Lys Phe Thr Val
20

<210> 18

< 211> 47

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 18

Asn Tyr Ser Val Ile Ala Glu Asn Glu Met Thr Tyr Val Asn Gly Gly
1 5 10 15

Ala Asn Phe Ile Asp Ala Ile Gly Ala Val Thr Ala Pro Ile Trp Thr
20 25 30

Leu Asp Asn Val Lys Thr Phe Asn Thr Asn Ile Val Thr Leu Val
35 40 45

<210> 19

< 211> 408

< 212> ADN

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 19

atgatgatgc ctgcaaacta ctctgttatc gcagagaacg aaatgaccta cgtcaacggt 60

ggcgctaact tcatcgacgc tatcggcgct gttaccgctc ctatctggac tctggacaac 120

gttaagacct tcaacaccaa catcgtgact ctggttggca acaccttcct gcagtccacc 180

attaaccgca ccatcggtgt cctgttcagc ggcaacacca cctggaagga agtcggcaac 240

atcggcaaga acctgttcgg caccaatgtt aagggcaacc cgatcgagaa gaacaacttt 300

ggtgactatg ctatgaacgc tctgggcatt gctgctgctg tctacaacct gggcgtggct 360

cccaccaaga acaccgtcaa ggagactgag gttaagttca ctgtctaa 408

<210> 20

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 20

Lys Gly Asn Thr Phe Leu Gln Ser Thr Ile Asn Arg Thr Ile Gly Val
1 5 10 15

Leu

<210> 21

< 211> 46

< 212> PRT

< 213> Faecalibacterium prausnitzii

<400> 21

Val Lys Gly Asn Pro Ile Glu Lys Asn Asn Phe Gly Asp Tyr Ala Met
1 5 10 15

Asn Ala Leu Gly Ile Ala Ala Ala Val Tyr Asn Leu Gly Val Ala Pro
20 25 30

Thr Lys Asn Thr Val Lys Glu Thr Glu Val Lys Phe Thr Val
35 40 45

<210> 22

< 211> 8

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> péptido de señalización

<400> 22

Leu Glu Ile Ser Ser Thr Cys Asp
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, un polipéptido que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1 y que retiene el efecto antiinflamatorio de la SEQ ID NO:1 o un fragmento de dichos polipéptidos que tiene una longitud de por lo menos 10 aminoácidos y que retiene el efecto antiinflamatorio de la SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria.

2. El polipéptido para uso según la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal, seleccionada entre enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, ileítis y enteritis.

3. El polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha enfermedad inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

4. El polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho polipéptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2-7.

5. El polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho fragmento conservador de la invención comprende o consiste en un polipéptido seleccionado entre SEQ ID NO:8-18.

6. El polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho polipéptido corresponde a una secuencia de aminoácidos que tiene en la orientación del término N al término C:

- la secuencia de SEQ ID NO:8; y

- la secuencia SEQ ID NO:9,

en donde la secuencia SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9 están preferiblemente espaciadas entre 80 y 10 aminoácidos, preferiblemente entre 60 y 15 aminoácidos, y más preferiblemente entre 40 y 20 aminoácidos.

7. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria.

8. La secuencia de ácido nucleico para uso según la reivindicación 7, en donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico definida por la SEQ ID NO:19.

9. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria.

10. Una célula hospedante que ha sido transfectada, infectada o transformada por una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8 y/o un vector según la reivindicación 9, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria.

11. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, un vector según la reivindicación 9 o una célula hospedante según la reivindicación 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, un vector según la reivindicación 9 o una célula hospedante según la reivindicación 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

13. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 12, en donde dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal.

14. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en donde dicha enfermedad inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

15. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 12, en donde dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria que resulta de una activación de la vía de NFκB.

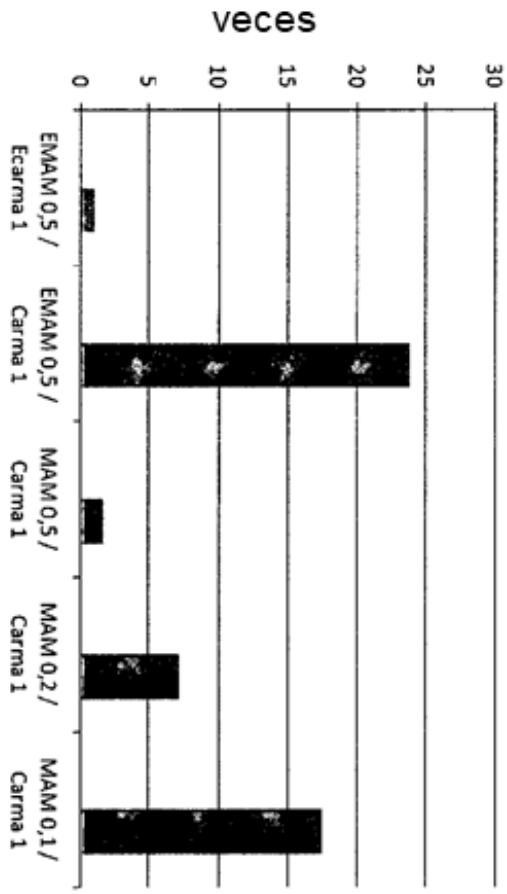

veces
0
5
10
15
20
25
30
EMAM 0,5 / Ecarma 1
EMAM 0,5 / Carma 1
MAM 0,5 / Carma 1
MAM 0,2 / Carma 1
MAM 0,1 / Carma 1

Figura 1

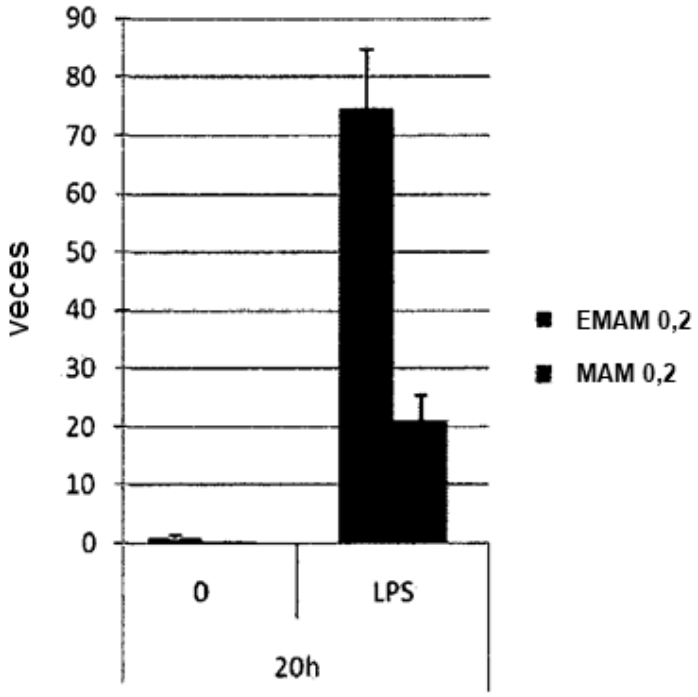


Figura 2


SEQ ID NO:3 MXMPANPSAVSENEMTYVMGGS-----VADYLAPAMGAAQWQNPHKNLIT
SEQ ID NO:4 MXMPANPSAVSENEMTYVMGGS-----VADYLAPAMGAAQWQNPHKNLIT
SEQ ID NO:5 MXMPANPSAVAENEMTYVVGGS-----LVDVLAPAMTTANWQNVSANVIK
SEQ ID NO:2 MXMPANYSVIAENEMTYVNGGANPIDAIGAVTAPIWTLDNVKTFNTNIVT
SEQ ID NO:6 MXMPANPTAVN---SEVVYGGADLFTILADTTAPIWNAANVKKFNTNLIT
SEQ ID NO:7 MXMPANPSAVN---AEVVYGGA-----VADYLPSAWTASSVKRFNSNIIT
IVGNKYVQGFLDNTVGAVPSGTWTPGDGLTGFGGQFSKIWKDNYTDNVTG
SEQ ID NO:4 IVGNKYVQGPLDNTVGANPSGTWTPGDGLTGFGGQFSTIWKDNYTDNVTD
SEQ ID NO:5 IVGNSFLAKYTNDVLAQLFDGNYVPGD-VIGYS---VKNLDKAYN---KG
SEQ ID NO:2 LVGNTPLQSTINRTIGVLPSGN-TTWKEVGNIG-------KNLPGTNVKG
SEQ ID NO:6 LISNSFPKKTVSNTLGVMPGGNWGKDGDKIPGE-------EGSINQNVPG
SEQ ID NO:7 LVSNSPTSHLLKATLGTMPSGSWGSDGVTLPGD-------NGTPS----G
SEQ ID NO:3 ESTGAQKPGYGALGVVNSILNVAGNLAAIYNLGPGTAKNIVGEGVYKA--
SEQ ID NO:4 ESTGAQKPGYGALGVVNSILNVAGNLAAIYNLGPGTAKNIVGEGVYKA--
SEQ ID NO:5 YGTPGGNWGP-AVGALNAGMQILGGLSAIYTLGSSSIGLETKSGTLPTL-
SEQ ID NO:2 NPIEKDNFGDYAMNAL-------GIAAAVYNLGVAPTKNTVKETEVKPTV
SEQ ID NO:6 LWNDDHTTRTDDMTFGNKVMQVLGMAAVGYTLGTTDAKVGPNDGVYGING
SEQ ID NO:7 LYNVNRLPGGEAQTPGNKIMTTLGLASVVYTLGMKDAAVLTAKKVTNSNG
SEQ ID NO:3 ----------
SEQ ID NO:4 ----------
SEQ ID NO:5 ----------
SEQ ID NO:2 ----------
SEQ ID NO:6 KL---------- 142
SEQ ID NO:7 QVWGDLPNNGGSGWVG 147

Figura 3

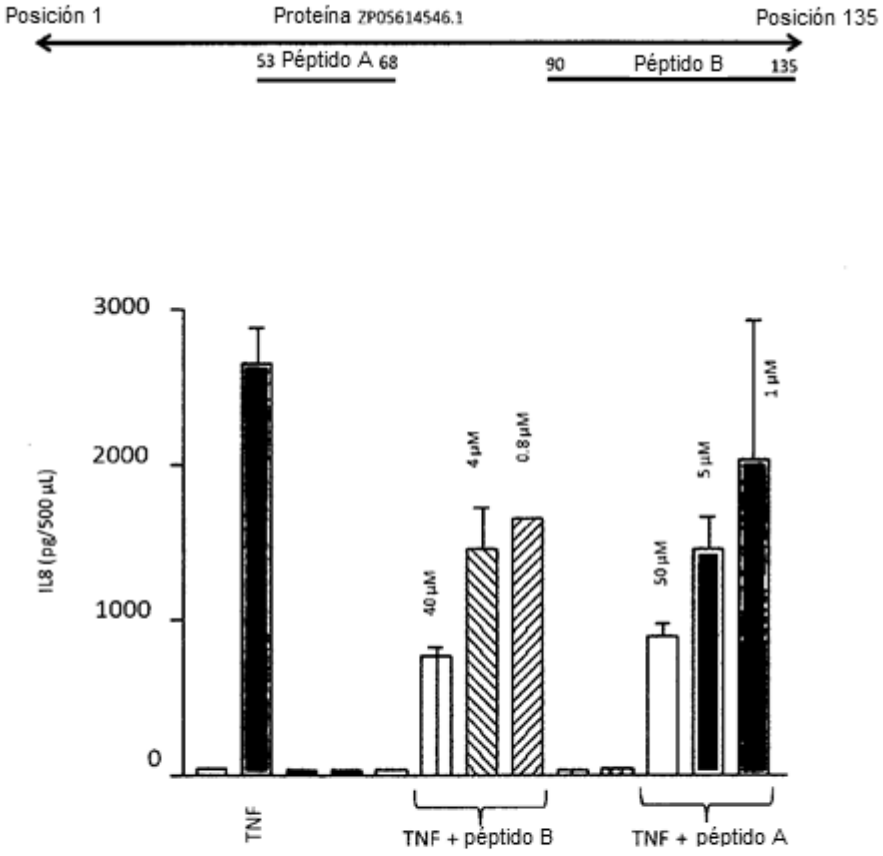

Posición 1
Proteína ZP05614546.1
Posición 135
53 Péptido A 68
90 Péptido B 135
3000
2000
1000
0
IL8 (pg/500 µL)
40 µM
4 µM
0.8 µM
50 µM
5 µM
1 µM
TNF
TNF + péptido B
TNF + péptido A

Figura 4

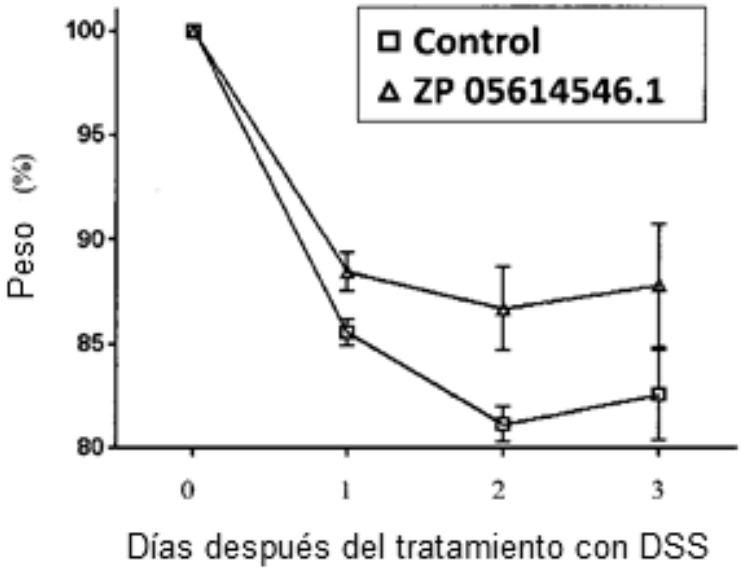


Figura 5

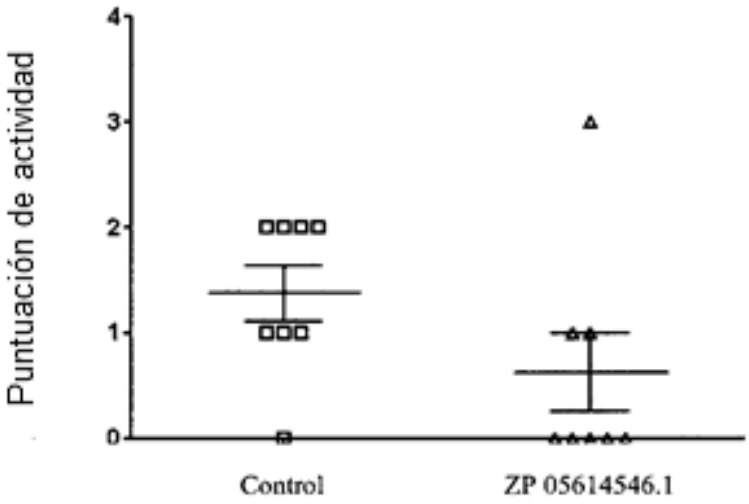


Figura 6

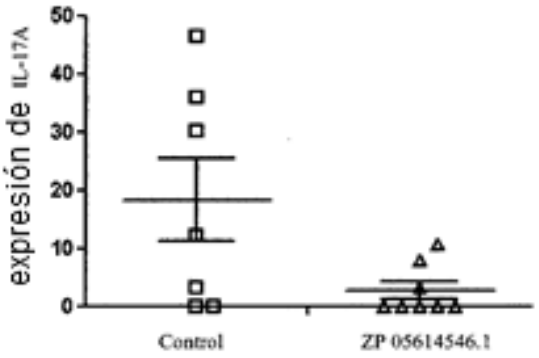


Figura 7

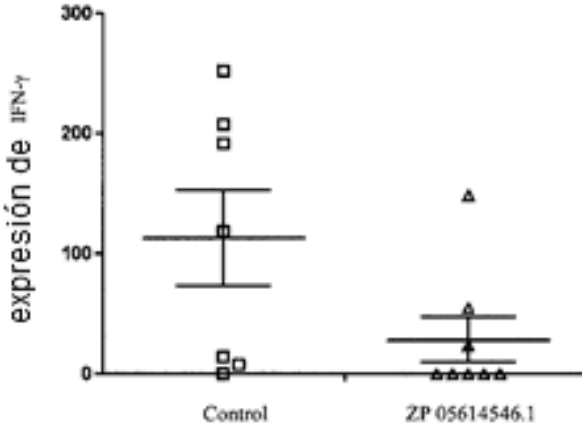


Figura 8