

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 498**

21 Número de solicitud: 202230873

51 Int. Cl.:

**C07K 7/00** (2006.01)

**C07K 1/14** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**10.10.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**09.05.2024**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (82.0%)**  
**Pabellon de Brasil - Pº de las Delicias, s/n**  
**41013 Sevilla (Sevilla) ES y**  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES**  
**CIENTÍFICAS (CSIC) (18.0%)**

72 Inventor/es:

**MILLÁN LINARES, María Del Carmen;**  
**MONTSERRAT DE LA PAZ, Sergio;**  
**MILLÁN RODRÍGUEZ, Francisco y**  
**VILLANUEVA LAZO, Álvaro**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel;**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Método para obtener péptidos antiinflamatorios y/o inmunomoduladores**

57 Resumen:

Método para la obtención de péptidos antiinflamatorios y/o inmunomoduladores.

La presente invención se relaciona con método para obtener péptidos a partir de hidrolizados de semillas, donde dichos péptidos tienen capacidad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, y son absorbidos por el epitelio intestinal de forma intacta. En la invención también se contempla los péptidos obtenidos por este método, que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 54, así como la composición que comprende dichos péptidos y su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

ES 2 968 498 A1

## DESCRIPCIÓN

### **Método para obtener péptidos antiinflamatorios y/o inmunomoduladores**

5 La presente invención se relaciona con método para obtener péptidos con capacidad antiinflamatoria, y capaces de ser absorbidos por el epitelio intestinal de forma intacta, y los péptidos obtenidos por este método. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo médico, más concretamente, en el campo del tratamiento de enfermedades inflamatorias.

10

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La excesiva demanda de consumo y producción de proteína animal, con el consecuente severo impacto medioambiental, sitúa a las proteínas vegetales como una alternativa emergente en el sector agroalimentario donde la investigación biomédica y tecnológica de los alimentos funcionales suponen un valor añadido que ha generado un gran interés. Resultados previos de investigación sitúan a las semillas como el cáñamo como alternativa eficaz, con índices proteicos en harinas muy superiores a otros cultivos extendidos, como arroz o garbanzo, y superiores a otros emergentes como chía o moringa.

20

El cáñamo es uno de los cultivos que mejor se adapta a las condiciones medioambientales por su alta resistencia, menor trabajo y mínimos costes. Se trata de un cultivo altamente beneficioso para el medioambiente. La harina desengrasada de cáñamo posee una riqueza proteica superior al 33% y su composición en aminoácidos esenciales se ajusta a las recomendaciones de la FAO. Actualmente, la bioactividad de algunos hidrolizados proteicos de fuentes vegetales ofrecen una interesante oportunidad para crear una nutrición funcional y personalizada.

25

Así, en la obtención y desarrollo de alimentos funcionales, los péptidos bioactivos, presentes en los hidrolizados proteicos, entrarían en la formulación como un complemento, enriqueciendo y dotando de un valor añadido a los alimentos tradicionales. No obstante, a pesar de que los péptidos bioactivos tienen numerosas posibilidades, existen algunas limitaciones a la producción de grandes cantidades para satisfacer las crecientes demandas del mercado. En la actualidad, la producción y la

35

utilización de péptidos bioactivos no han desplegado todo su potencial debido a dos grandes desafíos: 1) la eficiencia en la utilización de recursos y materias primas mediante la optimización de los procesos implicados en el desarrollo y producción de hidrolizados proteicos con actividad biológica a partir de fuentes vegetales. Hoy en día, los preparativos de escala de laboratorio no están optimizados y se reducen a cantidades volumétricas bajas. En este sentido, la falta de bioprocesos viables, transferibles a escala industrial, es un importante obstáculo para la rápida introducción de los péptidos bioactivos en los mercados de consumo; y 2) la escasa evidencia sobre si los péptidos bioactivos ingeridos en la dieta alcanzan la circulación sistémica en su forma intacta para poder ejercer sus efectos beneficiosos *in vivo*.

Estudios recientes a escala de laboratorio han demostrado *in vitro* que hidrolizados proteicos de la semilla de cáñamo industrial obtenidos mediante hidrólisis enzimática pueden disminuir el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en células del sistema inmune innato periférico como los monocitos (Rodríguez-Martin NM, et al. 2020. Biomolecules, 10: 803) y del sistema nervioso central (SNC) como la microglía activada (Rodríguez-Martin NM, et al. 2019. Food Funct., 10: 6732-6739). Sin embargo, hasta ahora, pocos estudios han evaluado la capacidad de estos productos de pasar al torrente sanguíneo y llegar a su diana terapéutica, ni tampoco se han identificado mediante técnicas ómicas los péptidos bioaccesibles.

Por otro lado, aunque la ciencia moderna ha desarrollado diversos medicamentos para el tratamiento de las enfermedades crónicas, la mayoría de estos fármacos son enormemente caros y están asociados con efectos secundarios graves y al aumento de la morbilidad. La alimentación es uno de los principales factores que incide en la modulación de la respuesta inflamatoria que se da en el organismo. A través de diversos efectos sobre las células y sus rutas metabólicas, la alimentación provoca cambios en el normal funcionamiento de los diferentes sistemas involucrados en el proceso inflamatorio, pues los alimentos pueden comportarse como metabolitos celulares pudiendo actuar como mensajeros intracelulares pro o anti-inflamatorios.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar nuevos compuestos naturales, cuya producción supere los inconvenientes mencionados arriba, y que puedan emplearse en el tratamiento de enfermedades inmunoinflamatorias, suponiendo una alternativa a los productos que existen en el estado de la técnica, de

origen sintético en la mayoría de los casos, y que no estén asociados con efectos secundarios graves o morbilidad.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Los autores de la presente invención han desarrollado un método que permite la identificación de péptidos con actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora que son absorbidos por el epitelio intestinal de forma intacta, es decir, no son metabolizados, por lo que pueden alcanzar la circulación sistémica y ejercer su actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora en el tejido/órgano que sea necesario. Por lo tanto, los péptidos así identificados (i) presentan actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, y (ii) son absorbidos por el epitelio intestinal de forma intacta. Mayoritariamente, los péptidos obtenidos tienen un peso molecular menor de 1.000 Da.

15 Para la identificación de dichos péptidos, los inventores de la presente invención partieron de un hidrolizado proteico de semilla de cáñamo industrial (*Cannabis sativa* L.) obtenido mediante hidrólisis enzimática de grado alimentario. Tras varios procesos de purificación, se identificaron todos los péptidos presentes en el hidrolizado mediante técnicas proteómicas. Para evaluar la capacidad de atravesar el epitelio intestinal y alcanzar la circulación sistémica, los inventores de la presente invención desarrollaron un sistema de absorción intestinal tipo *transwell* que permite, tras un proceso de aislamiento y purificación, la identificación de los péptidos con capacidad de alcanzar la circulación sistémica de forma intacta, es decir, los péptidos que son bioaccesibles. Así, gracias a este sistema de absorción intestinal, es posible averiguar si un péptido bioactivo con propiedades terapéuticas es bioaccesible, es decir, es capaz de alcanzar la circulación sistémica en su forma intacta y mantener su actividad terapéutica in vivo. Finalmente, los péptidos bioaccesibles fueron sometidos a ensayos celulares de inhibición de citoquinas inflamatorias, identificando aquellos con capacidad de actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora sobre células del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo, modulando la expresión de genes relacionados con la inflamación (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10). Por lo tanto, los péptidos obtenidos por el método aquí desarrollado hace posible su uso en el tratamiento de enfermedades inmunoinflamatorias de una manera más eficaz que otros compuestos del estado de la técnica: no son tóxicos ni provocan efectos adversos al ser productos de origen natural, y tras su ingesta alcanzan el torrente circulatorio de forma intacta (son bioaccesibles)

20

25

30

35

por lo que mantienen su actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora (son bioactivos en el órgano diana).

Por lo tanto, en base a esta invención, se han desarrollado una serie de aspectos que  
5 serán descritos en detalle a continuación.

### Método de la invención

En un aspecto, la presente invención se relaciona con un método para obtener un  
10 péptido (i) que presenta actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, y (ii) es absorbido por el epitelio intestinal de forma intacta, , de aquí en adelante “método de la invención”, que comprende:

- a) Hidrolizar un extracto proteico procedente de una semilla con una endoproteasa para obtener un primer hidrolizado proteico,
- 15 b) Filtrar el primer hidrolizado proteico a través de un soporte de membrana semipermeable que comprende células epiteliales intestinales, para obtener un segundo hidrolizado proteico,
- c) Comparar el primer y segundo hidrolizado proteico para seleccionar aquellos péptidos presentes en ambos hidrolizados, y
- 20 d) Evaluar la capacidad de los péptidos seleccionados en la etapa (c) de inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias.

En una primera etapa [etapa a)] el método de la invención comprende hidrolizar un  
25 extracto proteico procedente de la semilla con una endoproteasa para obtener un primer hidrolizado proteico.

Métodos para obtener extractos proteicos a partir de vegetales son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y su aplicación es práctica de rutina para el experto en la materia. Una vez obtenido el extracto proteico, se procede a la hidrólisis del mismo  
30 mediante una endoproteasa. Cualquiera de las endoproteasas que existen en el estado de la técnica puede usarse para poner en práctica la etapa a) del método de la invención. En una realización particular del método de la invención, sola o en combinación con todas o cada una de las anteriores realizaciones particulares, las endoproteasas son de amplio espectro. Las endoproteasas de amplio espectro hidrolizan enlaces amídicos  
35 dentro de la cadena de la proteína. Ejemplos de endoproteasas incluyen, sin limitar a,

serinproteasas, Neutrase®, endoproteasa procedente de *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme®) y endoproteasas procedentes de *Bacillus* spp. (Protamex®). En una realización más particular del método de la invención, la endoproteasa es subtilisina (Alcalase®).

5

La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. Las condiciones necesarias para llevar cabo la hidrólisis proteica en función del sustrato de partida son práctica de rutina para el experto en la materia. El sustrato se disuelve o resuspende en agua hasta que el pH y la

10 temperatura se estabilizan; a continuación, se agrega la endoproteasa dando inicio a la hidrólisis. En el método de la invención, el sustrato es el extracto proteico procedente de una semilla. Ejemplos de semillas que pueden emplearse en el método de la invención incluyen, sin limitarse a judía (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glycine max*), haba (*Vicia faba*), lenteja (*Lens culinaris*), garbanzo (*Cicer arietinum*), guisante (*Pisum*

15 *sativum*), algarroba (*Ceratonia siliqua*), altramuz (*Lupinus* spp), cacahuete (*Arachis hypogaea*), alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium pratense*), veza (*Vicia sativa*), cáñamo (*Cannabis sativa*), kiwicha (*Amaranthus caudatus*), moringa (*Moringa oleifera*), chía (*Salvia hispánica*), lino (*Linum usitatissimum*), olivo (*olea europaea*), sésamo (*Sesamum indicum*), trigo (*triticum* spp), quinoa (*Chenopodium quinoa*) Sorgo (*Sorghum*

20 spp) Mijo perla (*Pennisetum glaucum*) Mijo menor (*Setaria italica*) y Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). No obstante, en una realización particular del método de la invención, sola o en combinación con todas y/o cada una de las realizaciones particulares anteriores, la semilla es de una planta de cáñamo (*Cannabis sativa* L.).

25 A medida que la hidrólisis progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En los casos de hidrólisis enzimática, el pH se mantiene en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica, la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. También puede ser retirada del medio mediante

30 filtración y la proteína finalmente precipitada.

Tras la etapa a), se obtiene un primer hidrolizado proteico (también denominado extracto peptídico). Opcionalmente, éste primer hidrolizado proteico puede ser sometido a un desalado, por ejemplo, con columnas ZipTip C18. En la separación de aminoácidos y

35 péptidos mediante fase reversa la resina más comúnmente empleada posee una cadena

lineal de 18 carbonos y se denomina como C18  $[(\text{SiO}_2)]-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ . La muestra (en esta invención el primer hidrolizado proteico) se aplica a la columna en solución acuosa acidificada, por ejemplo, con ácido trifluoroacético (un ácido orgánico volátil) a una riqueza mayor del 99%.

5

Como entiende el experto en la materia, el método de la invención puede comprender la separación de los péptidos contenidos en el primer hidrolizado proteico mediante, por ejemplo, análisis por espectrometría de masas de alta resolución. Así, en una realización particular del método de la invención, sola o en combinación con todas y/o cada una de las realizaciones particulares anteriores, tras la etapa a) se procede al aislamiento de los péptidos del primer hidrolizado proteico, más preferiblemente, mediante espectrometría de masas de alta resolución, aún más preferiblemente, mediante un sistema de cromatografía líquida con nanoflujo de ultra alta presión. Una vez eluída la columna e identificados los distintos péptidos comprendidos en el primer hidrolizado proteico, se evalúa su bioaccesibilidad utilizando un sistema celular tipo *transwell* de absorción intestinal.

10  
15

En la presente invención se entiende por “bioaccesibilidad”, a la capacidad del péptido de ser absorbido por el epitelio intestinal de forma intacta y alcanzar la circulación sistémica.

20

En la presente invención, se entiende por “epitelio intestinal” a la superficie de la mucosa del tracto gastrointestinal que está revestida de células epiteliales que establecen una barrera efectiva, mediante uniones intercelulares, entre el medio interno y el medio externo, impidiendo el paso de sustancias potencialmente nocivas.

25

En la presente invención, se entiende que un péptido es “absorbido por el epitelio intestinal de forma intacta” a aquel péptido que, tras atravesar la barrera intestinal o ser absorbido por el epitelio intestinal, presenta las mismas características estructurales y químicas que antes de atravesar dicha barrera, y por lo tanto, conserva su funcionalidad. En la presente invención, dicha funcionalidad es una actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora.

30

En la presente invención, se entiende por “circulación sistémica” o “circulación mayor” a la circulación sanguínea que transporta sangre rica en oxígeno desde el ventrículo

35

izquierdo del corazón hacia la arteria aorta y a las ramas que distribuyen dicha sangre por todo el cuerpo.

5 Por lo tanto, en la presente invención se entiende que un péptido es “capaz de ser absorbido por el epitelio intestinal de forma intacta y alcanzar la circulación sistémica” a que el péptido de la invención (péptido obtenido por el método de la invención) puede atravesar la barrera intestinal sin sufrir ningún cambio estructural o químico y ser distribuido por el organismo de un sujeto a través del torrente sanguíneo, alcanzando un órgano diana en el que ejerce su actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora.

10

El sistema celular tipo *transwell* de absorción intestinal comprende una doble cámara: en la cámara superior se cultiva la célula de epitelio intestinal humano (por ejemplo, y sin limitar a, línea celular CACO-2) sobre una membrana semipermeable, y en la cámara inferior se añade, por ejemplo, PBS. Así, el primer hidrolizado proteico (o los péptidos  
15 aislados del primer hidrolizado proteico) se adiciona en la cámara superior, y pasadas unas horas se recoge el PBS de la cámara inferior, resultando en un segundo hidrolizado proteico (fracción inferior).

20 Por lo tanto, la etapa b) del método de la invención comprende filtrar el primer hidrolizado proteico a través de un soporte de membrana semipermeable que comprende células epiteliales intestinales, para obtener un segundo hidrolizado proteico.

En la presente invención se entiende por “membrana semipermeable”, a aquella membrana que permite de forma selectiva el paso de moléculas. En una realización  
25 particular del método de la invención, sólo o en combinación con todas y/o cada una de las realizaciones particulares anteriores, la membrana semipermeable impide el paso de péptidos con un peso molecular mayor de 1.000 Da. Por lo tanto, en otra realización particular, los péptidos obtenidos por el método de la invención presentan un peso molecular igual o inferior a 1.000 Da.

30

En la presente invención se entiende por “célula epitelial intestinal” a aquella célula que forma parte del epitelio que recubre el intestino. Cualquier célula epitelial intestinal puede usarse en el método de la invención. Ejemplos de células epiteliales intestinales incluyen, sin limitar a, CACO-2, HIEC-6, FHC, TC7, T84 y HT-29 En una realización  
35 particular del método de la invención, sola o en combinación con todas y/o cada una de



las realizaciones particulares anteriores, la célula epitelial intestinal es la línea celular CACO-2.

Una vez obtenido el segundo hidrolizado proteico se procede a identificar los péptidos  
5 presentes en este hidrolizado mediante, por ejemplo, las técnicas mencionadas en los  
párrafos anteriores. Así, una vez identificados los péptidos presentes en el primer y  
segundo hidrolizado proteico, se procede a comparar los mismos y seleccionar aquellos  
que están presentes en ambos hidrolizados. Como entiende el experto en la materia,  
los péptidos presentes en ambos hidrolizados serán aquellos que no han sido  
10 metabolizados por las células intestinales del soporte de membrana semipermeable, y  
que llegan de forma intacta al torrente circulatorio. La identificación y comparación de  
los péptidos presentes en ambos hidrolizados puede llevarse a cabo mediante sistemas  
informáticos ampliamente conocidos en el estado de la técnica.

15 Finalmente, se procede a analizar la capacidad para modular la expresión de citoquinas  
proinflamatorias mediante ensayos celulares de los péptidos bioactivos obtenidos en la  
etapa anterior identificados como bioaccesibles, [etapa d) del método de la invención].  
Ejemplos de citoquinas inflamatorias incluyen, sin limitar a, TNF, IL-1 $\beta$ , IL6, CCR2, y  
CCL2. Ensayos sobre como analizar la expresión de citoquinas proinflamatorias,  
20 incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de ARN y cuantificación mediante PCR  
cuantitativa de las citoquinas producidas por las células, determinación de la producción  
de citoquinas producidas por las células mediante ELISA, etc. así como los ensayos  
descritos en los ejemplos que ilustran la invención. Ensayos y técnicas sobre como  
analizar la expresión de citoquinas proinflamatorias son ampliamente conocidas en el  
25 estado de técnica y su empleo es práctica de rutina para el experto en la materia.

Por otro lado, como entiende el experto en la materia, el orden de las etapas del método  
de la invención podría cambiarse. Así, tras la etapa a) del método de la invención, sería  
posible identificar los péptidos presentes en el primer hidrolizado proteico y evaluar la  
30 capacidad de dichos péptidos de inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias  
[etapa d)]. A continuación, los péptidos que presenten esta capacidad serían filtrados a  
través del soporte de membrana semipermeable que comprende células epiteliales  
intestinales, para obtener un segundo hidrolizado proteico [etapa b)], y finalmente  
comparar los péptidos capaces de inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias con  
35 los péptidos presentes en el segundo hidrolizado proteico. De este modo, todos los

péptidos presentes tanto en el primer como en el segundo hidrolizado proteico serán aquellos (i) que presentan actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, y (ii) son absorbidos por el epitelio intestinal de forma intacta.

- 5 Como resultado del método de la invención, se obtienen unos péptidos que (i) que presentan actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, y (ii) son absorbidos por el epitelio intestinal de forma intacta, siendo útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, la presente invención se relaciona con un péptido obtenido por el método de la invención. Los péptidos obtenidos a partir del método de la invención
- 10 constituyen otro aspecto inventivo que será descrito a continuación junto con otros aspectos derivados de él.

#### Péptidos de la invención

- 15 La puesta en práctica del método de la invención con, por ejemplo, un extracto proteico procedente de una semilla de *C. sativa* (cáñamo) y la endoproteasa subtilisina, permite obtener péptidos que (i) que presentan actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, y (ii) son absorbidos por el epitelio intestinal de forma intacta.
- 20 En vista de lo anterior, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un péptido, de aquí en adelante "péptido de la invención", caracterizado porque
- es absorbido por el epitelio intestinal de forma intacta y alcanzar la circulación sistémica,
  - presenta actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, y
- 25 - comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AMRNPLAGK (SEQ ID NO: 1), DDNPRRF (SEQ ID NO: 2), DDRNSIIR (SEQ ID NO: 3), DESYRQQ (SEQ ID NO: 4), DRNSIIR (SEQ ID NO: 5), DSETVKRL (SEQ ID NO: 6), GFEWIAVK (SEQ ID NO: 7), GFEWVSFK (SEQ ID NO: 8), GKDNIK (SEQ ID NO: 9), GKDNIKQ (SEQ ID NO: 10), GKLDLVKPQ (SEQ ID
- 30 NO: 11), GNPEDFE (SEQ ID NO: 12), HFNLDH (SEQ ID NO: 13), HVREGDIV (SEQ ID NO: 14), IDRPSQA (SEQ ID NO: 15), IDRPSQAD (SEQ ID NO: 16), IKEGDMVAM (SEQ ID NO: 17), KEGGVLPQIK (SEQ ID NO: 18), KLDLVKPQ (SEQ ID NO: 19), KN(+0.98)GMMAPH (SEQ ID NO: 20), KNAIYTPH (SEQ ID NO: 21), KNGMMAPH (SEQ ID NO: 22), LNDKFKL (SEQ ID NO: 23), MRNPLAGK (SEQ ID
- 35 NO: 24), N(+0.98)YRNIFK (SEQ ID NO: 25), NAIYTPH (SEQ ID NO: 26), NIDRPSQA

(SEQ ID NO: 27), NNYNLPIL (SEQ ID NO: 28), NQDDFRGS (SEQ ID NO: 29), NQLDMSPR (SEQ ID NO: 30), NRDDMRE (SEQ ID NO: 31), NYRNIFK (SEQ ID NO: 32), PDRHQKL (SEQ ID NO: 33), PHQEFPQ (SEQ ID NO: 34), QADIFNPR (SEQ ID NO: 35), QHRWQSQ (SEQ ID NO: 36), QNQSPRYS (SEQ ID NO: 37), RNIFKGF (SEQ ID NO: 38), RNPLAGK (SEQ ID NO: 39), RNPLAGKV (SEQ ID NO: 40), RQNIDRPS (SEQ ID NO: 41), SAERGFLY (SEQ ID NO: 42), SEDHTAKF (SEQ ID NO: 43), SETARKIQ (SEQ ID NO: 44), SETVKRLQ (SEQ ID NO: 45), SKGYAVASAS (SEQ ID NO: 46), SQQTRYE (SEQ ID NO: 47), SRRFHLA (SEQ ID NO: 48), TELAHLK (SEQ ID NO: 49), TKETGQAIQ (SEQ ID NO: 50), VFDGELRE (SEQ ID NO: 51), VKEPVFSF (SEQ ID NO: 52), VREPVFSF (SEQ ID NO: 53), y VVRYTIQ (SEQ ID NO: 54).

Adicionalmente, en una realización particular, el péptido de la invención tiene un peso molecular igual o inferior a 1.000 Da.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “péptido” a la cadena lineal de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces químicos de tipo amídico, también llamado enlace peptídico. El péptido de la invención puede comprender un número variable de aminoácidos, desde 7 (incluido) hasta 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 aminoácidos (incluido).

Tal como se ha explicado anteriormente, en la presente invención, se entiende por “epitelio intestinal” a la superficie de la mucosa del tracto gastrointestinal que está revestida de células epiteliales que establecen una barrera efectiva, mediante uniones intercelulares, entre el medio interno y el medio externo, impidiendo el paso de sustancias potencialmente nocivas.

En la presente invención, se entiende que un péptido es “absorbido por epitelio intestinal de forma intacta” a aquel péptido que, tras atravesar la barrera intestinal o ser absorbido por el epitelio intestinal, presenta las mismas características estructurales y químicas que antes de atravesar dicha barrera, y por lo tanto, conserva su funcionalidad. En la presente invención, dicha funcionalidad es actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora.

En la presente invención, se entiende por “circulación sistémica” o “circulación mayor” a la circulación sanguínea que transporta sangre rica en oxígeno desde el ventrículo izquierdo del corazón hacia la arteria aorta y a las ramas que distribuyen dicha sangre por todo el cuerpo.

5

Por lo tanto, en la presente invención se entiende que un péptido es “capaz de ser absorbido por el epitelio intestinal de forma intacta y alcanzar la circulación sistémica” a que el péptido de la invención puede atravesar la barrera intestinal sin sufrir ningún cambio estructural o químico y ser distribuido por el organismo de un sujeto a través del torrente sanguíneo, alcanzando un órgano diana en el que ejerce su actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora.

El péptido de la invención puede llevar unido en uno o ambos de sus extremos distintas moléculas, tales como marcadores o péptidos señal, y dichas moléculas pueden ir unidas directamente a los extremos carboxilo o amino terminal del péptido o unidas a través de un espaciador o linker.

Así, en una realización particular del péptido de la invención, sola o en combinación todas y/o con cada una del resto de realizaciones particulares, el péptido de la invención comprende un marcador en uno de sus extremos. En el contexto de la presente invención, se entiende por “marcador” a aquella molécula que permite la identificación de los péptidos de la invención. El marcador puede ser un “péptido marcador” para la identificación y/o la localización del péptido de la invención ya que dichos marcadores corresponden a sitios de unión a determinadas moléculas o átomos, como la cadena de histidinas, la GST, la avidina, la estreptavidina, etc., o porque son fácilmente detectables por técnicas inmunoquímicas, como hemaglutinina, VSV-G, HSVtk, FLAG, V5, myc, etc., o porque son fácilmente observables, como las proteínas fluorescentes. El péptido marcador VSV-G pertenece a la glicoproteína del virus vesicular de la estomatitis. El péptido marcador HSVtk pertenece a la timidina quinasa del virus del herpes simple 1. El péptido FLAG es un epítipo de 8 aminoácidos diseñado específicamente como marcador de proteínas recombinantes. V5 es un pequeño epítipo presente en las proteínas P y V del paramixovirus del virus de simio 5 (SV5). El epítipo myc tiene 10 aminoácidos y es parte de la secuencia del factor de transcripción c-myc humano. Así, en una realización particular del péptido de la invención, sola o en combinación con todas y/o cada una del resto de realizaciones particulares, el marcador del péptido de la

invención se selecciona del grupo que consiste en c-myc, FLAG, HA, cadena de histidinas, GST, biotina, VSV-G, HSVtk, V5, biotina, avidina, estreptavidina, proteína de unión a maltosa y una proteína fluorescente.

- 5 En otra realización particular, sola o en combinación con todas y/o cada una del resto de realizaciones particulares, el péptido de la invención comprende un péptido señal en uno de sus extremos.

10 En la presente invención se entiende por “péptido señal” a la secuencia de entre 3 y 60 aminoácidos (ambos extremos incluidos) que dirige el transporte del péptido hacia una localización subcelular determinada, como puede ser el retículo endoplasmático, la mitocondria o el núcleo. El péptido señal puede dirigir también el transporte de la proteína fuera de la célula, lo que podría equivaler a su secreción o a su transporte al periplasma celular, en el caso de células como *Escherichia coli*. Ejemplos de péptido  
15 señal para dirigir el transporte de un péptido incluyen, pero no se limitan a, pelB, stII, ecotina, lamB, herpes GD, 1pp, fosfatasa alcalina, invertasa, factor alfa y la secuencia líder de la proteína A. Así, en otra realización más particular, sola o en combinación con todas y/o cada una de las realizaciones particulares anteriores, el péptido señal del péptido de la invención se selecciona del grupo que consiste en pelB, stII, ecotina, lamB,  
20 herpes GD, 1pp, fosfatasa alcalina, invertasa, factor alfa y la secuencia líder de la proteína A.

Como entiende el experto en la materia, también cabe la posibilidad de que los péptidos de la invención lleven unidos simultáneamente tanto el marcador como el péptido señal, bien en diferentes extremos de los péptidos de la invención o en el mismo extremo. Así,  
25 dentro de la presente invención, también se contemplan las uniones [péptido señal]-[marcador]-[péptido de la invención] y [marcador]-[péptido señal]-[péptido de la invención], donde la unión [marcador]-[péptido señal] pueden ir en el extremo amino o carboxilo terminal del péptido de la invención. Asimismo, si se cree conveniente, también  
30 puede emplearse más de un marcador.

Finalmente, tanto el marcador como el péptido señal pueden ir unidos a los péptidos de la invención directamente o a través de un espaciador o linker. En la presente invención, se entiende por “unido directamente” a la unión covalente entre dos grupos diferentes  
35 que no tiene ningún átomo intermedio entre los dos grupos que están uniéndose. En la

presente invención se entiende por “espaciador” o “ligador” o “linker” a la molécula que sirve de nexo de unión entre dos dominios o dos moléculas. Por ejemplo, secuencias espaciadoras pueden usarse para proporcionar un sitio de interés que facilite la manipulación de la proteína. También puede emplearse un espaciador para potenciar la

5 expresión de la proteína, o para optimizar la estructura terciaria de la misma y asegurar una adecuada interacción de los componentes con la molécula diana. Ejemplos de espaciadores incluyen, sin limitarse a, péptidos que comprenden la secuencia GGSSRSSSSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 55), GSGRSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), EGSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 57), EGKSSGSGSESKSTQ (SEQ ID NO: 58),

10 EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 59), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 60), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 61) y ESGSVSSEELAFRSLD (SEQ ID NO: 62). Otros ejemplos no limitativos de péptidos flexibles incluyen los siguientes: el péptido de secuencia TATPATTPTTAPTAGT (SEQ ID NO: 63); el péptido de secuencia TATPATTPTTAPTAGTTATPATTPTTAPTAGT (SEQ ID NO: 64); el péptido de

15 secuencia GTKVHMK (SEQ ID NO: 65); la hebra conectora 3 de la fibronectina humana; la subsecuencia PGTSGQQPSVGQQ (SEQ ID NO: 66) y dentro de esa subsecuencia el fragmento GTSGQ (SEQ ID NO: 67); la secuencia de 10 aminoácidos de la región de la bisagra superior de la IgG3 murina PKPSTPPGSS (SEQ ID NO: 68); el péptido de secuencia APAETKAEPMT (SEQ ID NO: 69); el péptido de secuencia GAP; el péptido

20 de secuencia SGGSGSGGQ (SEQ ID NO: 70); y el péptido de secuencia GGSSRSSS (SEQ ID NO: 71).

Asimismo, el péptido de la invención puede hallarse flanqueado de pequeños fragmentos polipéptidicos cuya presencia es necesaria y/o ventajosa para la expresión

25 del polipéptido en un vector adecuado o la actividad de la proteína. Dentro de éstos se encuentran tres aminoácidos en el extremo N-terminal (MNS, es decir Metionina-Asparagina-Serina), cuya secuencia se incluye para facilitar la iniciación de la traducción y acomodar sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción. También se incluyen aquí secuencias que permiten una mejora en la purificación del polipéptido,

30 tales como una cola de residuos de histidinas en el extremo C-terminal, cuando ésta, preferiblemente, consiste en, al menos, 6 residuos de histidina.

Adicionalmente, los extremos carboxilo y amino terminal del péptido de la invención pueden estar protegidos contra la proteólisis. Por ejemplo, el extremo amino terminal

35 puede estar en forma de grupo acetilo (Ac) y/o el extremo carboxilo terminal puede estar

en forma de grupo amida (Am). También cabe la posibilidad de llevar a cabo modificaciones internas de los péptidos para que sean resistentes a la proteólisis. Ejemplos de estas modificaciones internas incluyen, sin limitar a, modificaciones en las que al menos un puente peptídico  $-\text{CONH}-$  se modifica y se reemplaza por un enlace

5 reducido ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), un enlace retroinverso ( $\text{NHCO}$ ), un enlace oximetileno ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), un enlace tiometileno ( $\text{CH}_2\text{-S}$ ), un enlace cetometileno ( $\text{CO-CH}_2$ ), un enlace hidroxietileno ( $\text{CHOH-CH}_2$ ), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o un enlace  $-\text{CH=CH}-$ . Los péptidos también pueden estabilizarse por cruzamiento intramolecular, por ejemplo, mediante la modificación al menos de dos residuos de aminoácidos con cadenas laterales de

10 oleofina, preferiblemente, cadenas alqueno  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , preferiblemente, cadenas pentel-2-il, seguidas de un entrecruzamiento de las cadenas tal como se describe en la tecnología denominada “staple” (Walensky et al., 2004, Science 205: 1466-1470). Todos estos péptidos modificados de forma química para resistir a la proteólisis, también están contemplados dentro de la presente invención.

15

Modificaciones adicionales al péptido de la invención comprenden la unión covalente a una molécula de polietilenglicol (PEG) por su extremo carboxilo terminal o a un residuo de lisina, con la finalidad de disminuir su eliminación urinaria y la dosis terapéutica, y de incrementar la vida media del péptido en el plasma sanguíneo. La vida media del péptido

20 también puede incrementarse mediante la inclusión del péptido en un material polimérico biodegradable y biocompatible para formar microesferas que son empleadas como un sistema de administración de fármacos. Polímeros y copolímeros incluyen, sin limitar a, poli (D, L-láctido-co-glicólico) o PLGA. Las técnicas y procedimientos de cómo fabricar microesferas o nanocápsulas lipídicas para su empleo en la administración de

25 fármacos son ampliamente conocidas por el experto en la materia.

Como entiende el experto en la materia, todas estas modificaciones son aplicables al péptido de la invención siempre y cuando el péptido modificado presente actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, y sea absorbido por el epitelio intestinal de

30 forma intacta.

Una vez obtenido el péptido de la invención mediante el método de la invención e identificada su secuencia de aminoácidos, el péptido de la invención puede ya obtenerse por otras técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica, tales como síntesis

35 química, recombinación genética, expresión del polinucleótido que codifica el

polipéptido de la invención, etc. Todas estas técnicas son prácticas de rutina para el experto en la materia.

Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una secuencia de  
5 nucleótidos que codifica para el péptido de la invención, de aquí en adelante “secuencia de nucleótidos de la invención”.

En la presente invención se entiende por “secuencia de nucleótidos” a la cadena de nucleótidos unidos entre sí a través de grupos fosfato. La secuencia de nucleótidos,  
10 denominada comúnmente ácido nucleico, puede estar formada por desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o cualquier sustrato que pueda ser incorporado en un polímero de ADN o ARN por una polimerasa o por una reacción sintética.

15 El término “codifica” se refiere al código genético que determina cómo una secuencia de nucleótidos se traduce en un polipéptido o una proteína. El orden de los nucleótidos de una secuencia determina el orden de los aminoácidos a lo largo de un péptido, un polipéptido o una proteína.

20 Las secuencias de nucleótidos de la invención pueden insertarse en un vector, por ejemplo, un vector de expresión. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, de aquí en adelante “vector de la invención”, que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención.

25 En la presente descripción, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede usarse para transportar o transferir otra molécula de ácido nucleico al interior de una célula. En la presente invención, dicha otra molécula de ácido nucleico es la secuencia de nucleótidos de la invención. El vector de expresión puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que pueda someterse convenientemente a  
30 procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención.

Un vector puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen, pero no se limitan a, elementos de control de la transcripción, como promotores u operadores,  
35 regiones o potenciadores de la unión a factores de transcripción, y elementos de control



para iniciar y terminar la transcripción. Algunos vectores son capaces de replicarse o dividirse autónomamente tras ser introducidos en la célula huésped, como los vectores bacterianos con un origen de replicación bacteriano o los vectores episomales de mamíferos. Otros vectores pueden integrarse en el genoma de la célula huésped y  
5 replicarse así junto con el genoma celular.

En general, un vector de expresión comprende, además de la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, pT7, plac, ptrc, ptac, pBAD, ret, etc.), al que está operativamente unido, y otras  
10 secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, como por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (tlt2, etc.), una señal de poliadenilación, un origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers),  
15 represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden emplearse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto incluyen, sin limitar a, plásmidos de expresión, vectores virales (ADN o ARN), cósmidos, cromosomas artificiales, etc. que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con la secuencia de nucleótidos de interés.  
20 La elección del vector dependerá de la célula huésped y del tipo de uso que se quiera realizar.

El experto en la materia apreciará que no existe limitación en cuanto al tipo de vector que puede ser utilizado, ya que dicho vector puede ser un vector de clonaje adecuado  
25 para la propagación o un vector de expresión. Así, vectores adecuados de acuerdo a la presente invención incluyen, sin limitar a, (i) vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCRI, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, (ii) vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras,  
30 plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, (iii) vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, (iv) vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y (v) vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores  
35 virales, entre los que se incluyen, sin limitar a, adenovirus, virus asociados a los

adenovirus así como retrovirus y lentivirus, así como vectores no virales entre los que se incluyen, sin limitar a, pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hygphCMV/Zeo, pCR3.1, pEFVHis, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER HCMV, pUB6N5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI.

Los vectores pueden ser administrados directamente al sujeto por métodos convencionales. Alternativamente, dichos vectores pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células, tanto procariotas como eucariotas. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma/s en el/los que se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por el experto en la materia, al igual que para la transformación de células procariotas y células eucariotas se pueden utilizar diferentes métodos ampliamente conocidas – transformación química, transfección, electroporación, microinyección, etc. – descritos en diversos manuales ampliamente conocidos en el estado de la técnica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula (o célula huésped), de aquí en adelante “célula de la invención”, que comprende la secuencia de nucleótidos o el vector de la invención descritos anteriormente. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, que incluyen, sin limitarse a, electroporación, fusión de protoplastos, coprecipitación con fosfato de calcio ( $\text{CaPO}_4$ ) y precipitación con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ).

La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un péptido, por ejemplo, una célula procariota o una célula eucariota.

La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Bacterias gram-positivas incluyen, sin limitar a, *Bacillus* (tales como *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus, lentus Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*), *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*,

*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* (tales como *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*), y *Streptomyces* (tales como *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*). Bacterias gram-negativas incluyen, sin limitar a, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *helicobacteria*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*.

Células eucariotas adecuadas para la expresión del péptido de la invención incluyen, sin limitar a, células de mamíferos, células de plantas, células de insectos, células de hongos y células de levaduras.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de células de mamíferos incluyen, sin limitar a, líneas celulares epiteliales (porcinas, humanas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, humanas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.), células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana 5 NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH Y MCF-7 y células hMSCs (*human mesenchymal stem cells*), y células GliNS2 (células madre de glioma).

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de células de plantas incluyen células de *Arabidopsis* (tal como *A. thaliana*), y *Nicotiana* sp. (tales como *N. tabacum* o *N. benthamiana*).

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de células de insectos incluyen células de *Spodoptera frugiperda* (tal como célula SF9, célula SF21 o célula Sf900+), célula de insecto BTI-Tn-5B1-4 procedente de *Trichoplusia ni* (High-five™, Invitrogen, Carlsbad Calif.), expresSF+®, células *Drosophila Schneider* 2 (S2), Se301, SeIZD2109, SeUCR1, MG-1, Tn368, HzAm1, Ha2302, Hz2E5 and High Five de Invitrogen.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de células de hongos incluyen, sin limitar a, una célula de *Acremonium*, *Aspergillus* (tales como *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. foetidus*, *A.*

japonicus, *A. nidulans*, *A. niger* o *A. oryzae*); *Aureobasidium*; *Bjerkandera* (tal como *Bjerkandera adusta*); *Ceriporiopsis* (tales como *C. aneirina*, *C. aneirina*, *C. caregiea*, *C. gilvescens*, *C. pannocinta*, *C. rivulosa*, o *C. subvermispora*); *Coprinus* (tal como *C. cinereus*); *Coriolus* (tal como *C. hirsutus*); *Cryptococcus*; *Filibasidium*; *Fusarium* (tales como *F. bactridioides*, *F. cerealis*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. graminum*, *F. heterosporum*, *F. negundi*, *F. oxysporum*, *F. pseudograminearum*, *F. reticulatum*, *F. roseum*, *Fusarium sambucinum*, *F. sarcochroum*, *F. sporotrichioides*, *F. sulphureum*, *F. torulosum*, *F. trichothecioides*, o *F. venenatum*), *Gibberella* (tal como *G. zeae*), *Humicola* (tales como *H. insolens* o *H. lanuginosa*); *Magnaporthe*; *Mucor* (tal como *Mucor miehei*); *Myceliophthora* (tal como *M. thermophila*); *Neocallimastix*; *Neurospora* (tal como *N. crassa*); *Paecilomyces*; *Penicillium* (tal como *P. purpurogenum*); *Phanerochaete* (tal como *P. chrysosporium*); *Phlebia* (tal como *P. radiata*); *Piromyces*, *Pleurotus* (tal como *P. eryngii*); *Schizophyllum*; *Talaromyces*; *Thermoascus*; *Thielavia* (tal como *T. terrestres*); *Tolypocladium*; *Trametes* (tales como *T. villosa*, o *T. versicolor*); o *Trichoderma* (tales como *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei* o *T. viride*).

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de células de levaduras incluyen células de los géneros *Saccharomyces* (tal como *S. cerevisiae*), *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia* (tales como *P. pastoris* o *P. methanolica*), *Arxula*, *Schwanniomyces*, *Candida* y *Yarrowia*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un extracto peptídico, de aquí en adelante “extracto peptídico de la invención”, que comprende el péptido de la invención.

25

En el contexto de la presente invención, se entiende por “extracto peptídico” a la solución obtenida por centrifugación a partir de una modificación química, física y/o enzimática realizada en un material de partida de naturaleza vegetal, y en el cual puede encontrarse como componente principal un conjunto de péptidos entre los cuales se encuentra el péptido de la invención.

30

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, de aquí en adelante “composición de la invención”, que comprende el péptido, la secuencia de nucleótidos, el vector, la célula y/o el extracto peptídico de la invención. Dentro del presente aspecto inventivo se contempla la posibilidad de que la composición comprenda combinaciones

35

del péptido, la secuencia de nucleótidos, el vector, la célula o el extracto peptídico de la invención. En una realización particular, dicha composición es una composición farmacéutica.

- 5 Como entiende el experto en la materia, el péptido, la secuencia de nucleótidos, el vector, la célula y/o el extracto peptídico de la invención tienen que estar presentes en una cantidad terapéuticamente eficaz en la composición para que estos puedan ejercer el efecto antiinflamatorio y/o inmunomodulador.
- 10 En la presente invención se entiende por “cantidad terapéuticamente efectiva” a una cantidad del péptido, la secuencia de nucleótidos, el vector, la célula y/o el extracto peptídico de la invención que, administrada en dosis y durante el período de tiempo necesario a un sujeto, sea efectiva a la hora de conseguir el resultado profiláctico o terapéutico deseado. La “cantidad terapéuticamente efectiva” puede variar con el  
15 estadio de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y se refiere a una cantidad que no presenta efectos adversos ni toxicidad y es capaz de alcanzar el efecto profiláctico o terapéutico deseado. El experto en materia, teniendo en cuenta todos estos factores, es capaz de determinar dicha cantidad terapéuticamente efectiva.
- 20 La composición de la invención puede comprender otros componentes, tales como diluyentes, excipientes, sales, etc. Así, en una realización particular, la composición de la invención comprende, adicionalmente, un excipiente.

- En la presente invención se entiende por “excipiente” a una sustancia inactiva usada  
25 para incorporar el principio activo (péptido de la invención). Además, puede ser usado para ayudar al proceso mediante el cual la composición es manufacturada. Ejemplos de excipientes incluyen, sin limitar a, aglutinantes (mantienen los ingredientes de una tableta unidos, tales como hidroxipropil, celulosa, xilitol, sorbitol, manitol, etc.), diluyentes (rellenan el contenido de una pastilla o cápsula, tales como, celulosa vegetal,  
30 fosfato cálcico dibásico, flor de cártamo, etc.), desintegradores (compuestos que se expanden y disuelven cuando se les moja causando que la tableta se rompa cuando llegue al tracto digestivo y libere los principio activos para su absorción), lubricantes (previenen que los ingredientes se agrupen en terrones, tales como talco, sílica, etc.), recubridores (protegen a los ingredientes de la tableta de los agentes externos, tales  
35 como celulosa, polímeros sintéticos, polisacáridos, etc.), edulcorantes, saborizantes y

colorantes.

La composición puede estar en forma de un sólido, por ejemplo, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas de gelatina, liposomas o supositorios. Los soportes sólidos  
5 apropiados pueden ser, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidina y cera.

La composición también puede comprender sales, principalmente, sales  
10 farmacéuticamente aceptables entre las que se incluyen, sin limitar a, las sales de adición de ácidos inorgánicos, tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, fosfato, difosfato y nitrato, o de ácidos orgánicos, tales como acetato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, lactato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, palmoato y estearato. También dentro del alcance de la presente invención, cuando se pueden  
15 utilizar, se encuentran las sales formadas a partir de bases, tales como el hidróxido de sodio o de potasio.

La composición de la invención puede ser una composición farmacéutica o una  
composición nutricional.

20

En la presente invención, se entiende por “composición farmacéutica” a la composición que puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, un humano, por vía oral, por vía parenteral, por vía tópica, mediante pulverización de inhalación, por vía intranasal o por vía rectal, en formulaciones de dosificación unitaria que contienen portadores,  
25 diluyentes, adyuvantes, vehículos y similares no tóxicos. El término composición farmacéutica incluye composiciones para su uso en sanidad humana o animal (composiciones veterinarias). La composición farmacéutica de la invención puede administrarse por cualquier vía apropiada (por ejemplo, oral, sublingual, perioral, intranasal, parenteral, transdérmica, tópica, etc.), para lo cual se utilizarán los  
30 excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma farmacéutica de administración elegida. Las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación son conocimiento general para el experto en la materia.

35

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco y liofilizado.

La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral.

Otra posibilidad es que la composición farmacéutica se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención también se pueden presentar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, emulsiones, suspensiones o jarabes. Los soportes líquidos apropiados pueden ser, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos, tales como glicerol o glicoles, así como sus mezclas, en proporciones variables, en agua.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El “vehículo” o “portador”, es preferiblemente una sustancia inerte con la finalidad de facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

La expresión “farmacológicamente aceptable” hace referencia a que el excipiente (tal como se ha definido previamente) o el vehículo está permitido y evaluado de modo que no cause daño al sujeto al que se le administra. Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacéuticamente adecuados, es decir, deben permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica y ser compatible con dichos componentes.

En la presente invención, se entiende por “composición nutricional” a aquella composición ingerida por los seres vivos por el cual el organismo recibe, transforma y utiliza sustancias químicas contenidas en los alimentos. Ejemplos de composiciones nutricionales incluyen, sin limitar a, un alimento, o un suplemento.

Ejemplos de alimentos incluyen, sin limitar a, producto lácteo, producto vegetal, producto cárnico, aperitivo, chocolate, bebida o alimento infantil. El producto lácteo se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, producto derivado de leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitar yogur o queso) o no fermentada (por ejemplo, pero sin limitar, helado, mantequilla, margarina, suero lácteo). La bebida puede ser, pero sin limitarse, cualquier zumo de frutas o leche no fermentada.

El término “suplemento”, sinónimo de cualquiera de los términos “suplemento dietético”, “suplemento nutricional”, “suplemento alimentario” o “suplemento alimenticio” es un componente o componentes destinados a complementar la alimentación. No se presentan como sustitutos de un alimento convencional ni como componente único de una comida o de la dieta alimenticia, sino como complemento de la dieta.

Adicionalmente, la composición de la invención, además del péptido, la secuencia de nucleótido, el vector y/o la célula de la invención, puede comprender otros compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades inmunoinflamatorias. Así, en una realización particular, la composición de la invención comprende, además un compuesto antiinflamatorio. Ejemplos de compuestos antiinflamatorios incluyen, sin limitar a, compuestos esteroideos, compuestos no esteroideos (también denominados AINES) y el grupo de fármacos antirreumatoides modificadores de la enfermedad o FARME. Entre los antiinflamatorios esteroideos se incluyen, sin limitar a, corticoides, tales como la dexametasona, la prednisona, etc. Ejemplos de antiinflamatorios no esteroideos incluyen, sin limitar a, inhibidores de la COX-2, ácido acetil salicílico, derivados del ácido propílico (como el ibuprofeno y naproxen), derivados del ácido acético (como la



indometacina), ácidos enólicos (como el piroxicam) y paracetamol. Ejemplos de FARME incluyen, sin limitar a, el metrotexato, la penicilamina, la cloroquina, la sulfasalazina y las sales de oro.

- 5 Por otro lado, el péptido, la secuencia de nucleótidos, el vector y/o la célula de la invención, así como las composiciones que los contienen, pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica, tal como se ha descrito en el párrafo anterior o, alternativamente, pueden ser
- 10 proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición de la invención.

#### Usos del péptido de la invención

- 15 Como se ha explicado al comienzo de la presente descripción, los péptidos de la invención tienen actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, lo que permite su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos que cursan con inflamación.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el péptido, la secuencia de nucleótidos, el vector, la célula, el extracto peptídico y/o la composición de la invención

20 para su uso como medicamento. Así, este medicamento tiene capacidad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora.

En la presente invención, se entiende que un medicamento presenta actividad antiinflamatoria cuando tiene capacidad de inducir la expresión de IL-10, una potente citoquina antiinflamatoria, así como de reprimir la expresión de TNF y/o IL-1 $\beta$ , citoquinas de naturaleza proinflamatoria, en células del sistema inmunitario. Ejemplo de un ensayo para comprobar si un péptido dado presenta actividad antiinflamatoria se describe en los Ejemplos de la presente descripción.

30

En la presente invención, se entiende que un medicamento presenta actividad inmunomoduladora, cuando presenta capacidad de modular la respuesta de células del sistema inmune humano como los macrófagos, siendo éstos, a su vez, capaces de modular la función de otras células inmunes como son los linfocitos T. Ejemplo de un

35 ensayo para comprobar si un péptido dado presenta actividad inmunomoduladora se

describe en los Ejemplos de la presente descripción.

Estas definiciones de actividad antiinflamatoria y actividad inmunomoduladora sin aplicables a todos los aspectos inventivos descritos en la presente descripción, es decir,  
5 tanto al método como al péptido de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el péptido, la secuencia de nucleótidos, el vector, la célula, el extracto peptídico y/o la composición de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

10

En la presente invención se entiende por “tratamiento” o “terapia” al conjunto de medios que se emplean en un sujeto para aliviar o curar una enfermedad, o para eliminar o disminuir los síntomas de una enfermedad. En la presente invención se entiende por “individuo” o “sujeto” a un miembro de una especie de animal, preferentemente  
15 mamífero e incluye, pero no se limita a, un animal doméstico, un primate y un humano; en el contexto de la presente invención, el individuo es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier raza o edad.

En la presente invención se entiende por “enfermedad inflamatoria” a aquella  
20 enfermedad que cursa con inflamación y que provoca unos niveles elevados de TNF en el individuo que la padece.

En una realización particular, sola o en combinación con todas y/o cada una de las realizaciones particulares anteriores, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo  
25 que consiste en una enfermedad autoinmune, cáncer, aterosclerosis, artrosis, artritis, diabetes, obesidad, síndrome metabólico, asma, enfermedad de Crohn, alzhéimer, hipertensión y dermatitis.

En la presente invención se entiende por “enfermedad autoinmune” a aquella  
30 enfermedad en la que el sistema inmunitario de un organismo ataca a sus propias células. Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, sin limitar a, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica, enfermedades inflamatorias, y trombocitopenia, enfermedades inmunes agudas o crónicas asociadas con el trasplante de órganos y alergias. Así, en una  
35 realización particular, sola o en combinación con todas y/o cada una de las anteriores,

la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en SIDA, síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica, enfermedades inflamatorias, y trombocitopenia, enfermedades inmunes agudas o crónicas asociadas con el trasplante de órganos y alergias.

5

En la presente invención se entiende por “cáncer” a aquella enfermedad en la que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos, provocando una metástasis. En la presente invención, los términos “cáncer” y “tumor” se consideran equivalentes. Ejemplos de cáncer, incluyen, sin limitar a, linfomas, leucemias, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, 10 cáncer de piel, cáncer de próstata y cáncer de estómago.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **Figura 1.** Representación esquemática del modelo celular tipo transwell de epitelio intestinal para el estudio de bioaccesibilidad.

**Figura 2.** Perfiles de peso molecular del hidrolizado proteico tras 20 minutos de hidrólisis con alcalasa (HPH20A (O)) y la fracción bioaccesible (HPH20A (T)) obtenidos mediante 20 UHPLC

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los 25 inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

### **Ejemplo 1 – Aislamiento e Identificación de los péptidos de la invención.**

#### Obtención del Hidrolizado de Cáñamo e identificación de péptidos por espectrometría de masas de alta resolución

30 El aislado de proteína de cáñamo se obtuvo a partir de harina desengrasada de cáñamo mediante la extracción con  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  al 0.25% (p/v) a un pH de 10.5 durante 1 hora. Después se centrifugó a 7500 rpm durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y se volvió a extraer el sedimento. Ambos sobrenadantes se ajustaron al punto isoelectrico de las proteínas del cáñamo (pH 4.3) y el precipitado se lavó con agua destilada ajustada 35 a pH 4.3. Posteriormente, se centrifugó para eliminar las sales residuales y otros

compuestos no proteicos. Luego el precipitado de proteína obtenido se sometió a liofilización y se almacenó a temperatura ambiente. La hidrólisis de aislado proteico de cáñamo se llevó a cabo en un reactor con control de pH y temperatura, empleándose las siguientes condiciones: pH 8, 50° C, E/S=03 UA/g subtilisina (Alcalase®), 20 minutos. La enzima fue inactivada por calentamiento a 85° C durante 15 minutos, y la mezcla fue centrifugada a 8500 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante de centrifugación fue utilizado como sustrato para la identificación de péptidos mediante espectrometría de masas de alta resolución. El análisis de rendimiento en peso en el aislado proteico de cáñamo y en el hidrolizado proteico de cáñamo, así como la riqueza proteica, se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Valores de rendimiento en peso y riqueza proteica de las fracciones proteicas de cáñamo.

	Rendimiento en peso (%)	Riqueza Proteica (%)
Aislado Proteico de Cáñamo	13.8 %	96.5 %
Hidrolizado Proteico de Cáñamo	83.6 %	86.6 %

La espectrometría de masas de alta resolución se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía líquida con nanoflujo de ultra alta presión acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro2 equipado con una fuente de iones de nanoelectrospray CaptiveSpray (Bruker Daltonics). Para el análisis, se cargó 200 ng del hidrolizado proteico en una columna capilar FIFTEEN C18 (Bruker Daltonics). Los péptidos se separaron a 30 °C utilizando un gradiente de 20 minutos a un caudal de 300 nL/minuto (fase móvil A (MPA): 0,1 % FA; fase móvil B (MPB): 0,1 % FA en acetonitrilo). Se aplicó un gradiente escalonado de 0 a 35 % de MPB durante 13 minutos, seguido de un paso de 35 a 90 % de MPB de 13 a 15 minutos, y finalizó con un lavado de 90 % de MPB durante 5 minutos adicionales durante un tiempo adicional. Tiempo de ejecución total de 20 minutos por análisis. timsTOF Pro2 se ejecutó en modo DDA-PASEF. Los espectros de masas para escaneos MS y MS/MS se registraron entre 100 y 1700 m/z. La resolución de movilidad de iones se fijó en 0,85–1,30 V s/cm<sup>2</sup> durante un tiempo de rampa de 100 ms. La adquisición dependiente de datos se realizó utilizando 4 escaneos PASEF MS/MS por ciclo con un ciclo de trabajo cercano al 100 %. Se aplicó un filtro poligonal en el espacio m/z y la movilidad iónica para excluir m/z baja, principalmente iones de carga única de la selección de precursores de PASEF. Se aplicó un tiempo de

exclusión activa de 0,4 minutos a los precursores que alcanzaron las 20.000 unidades de intensidad. La energía de colisión se incrementó gradualmente en función de la rampa de movilidad de iones, de 27 a 45 eV. Los datos sin procesar se analizaron en PEAKS Studio ProX. La biblioteca de referencia se adquirió de UniProt\_proteome\_Cannabis-sativa\_Feb22. Los datos sin procesar se analizaron con una tolerancia de error de masa principal establecida en 15 ppm y una tolerancia de error de masa de fragmento de 0,05 Da.

### **Ejemplo 2 – Identificación de los péptidos de la invención bioaccesibles.**

#### **Obtención de la fracción bioaccesible del Hidrolizado de Cáñamo e identificación de péptidos bioaccesibles por espectrometría de masas de alta resolución**

A nivel celular, se utilizó un modelo tipo transwell de absorción intestinal compuesto por la línea celular de epitelio intestinal humano CACO-2 (ATCC-HTB-37). En la zona apical (compartimento superior) se dispuso, sobre una membrana semipermeable, las células CACO-2 en monocapa a una densidad de  $5 \times 10^5$  células por inserto en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. La integridad de la monocapa se monitorizó mediante resistencia eléctrica transepitelial (TEER) usando un voltímetro durante 3-5 días, debiendo alcanzar una resistencia de  $1000 \Omega/\text{cm}^2$  aproximadamente (**Figura 1**). Dada estas condiciones, se añadió el hidrolizado proteico de cáñamo obtenido en el Ejemplo 1 a  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para llevar a cabo el estudio de bioaccesibilidad, se dispuso en la zona basolateral (compartimento inferior) de PBS. Los péptidos bioaccesibles presente en la fracción proteica de cáñamo recogida en PBS de la zona basolateral se identificaron por espectrometría de masas de alta resolución en las condiciones indicadas en el objetivo 1 (**Figura 2**). De entre todos los péptidos bioaccesibles se seleccionaron aquellos de menos de 1000 Da, identificando un total de 226 péptidos ( $< 1000$  Da), de los cuales 54 (ver **Tabla 2**) aparecen de forma intacta en el hidrolizado proteico de cáñamo e identificados en el Ejemplo 1.

**Tabla 2** – Péptidos bioaccesibles identificados en el hidrolizado de cáñamo.

	Secuencia	Longitud	Masa (Da)
SEQ ID NO:1	AMRNPLAGK	9	956.5225
SEQ ID NO:2	DDNPRRF	7	918.4307
SEQ ID NO:3	DDRNSIIR	8	987.5097
SEQ ID NO:4	DESYRQQ	7	924.3937
SEQ ID NO:5	DRNSIIR	7	872.4828

# ES 2 968 498 A1

SEQ ID NO:6	DSETVKRL	8	946.5083
SEQ ID NO:7	GFEWIAVK	8	948.5068
SEQ ID NO:8	GFEWVSFK	8	998.4861
SEQ ID NO:9	GKDNIK	7	786.4599
SEQ ID NO:10	GKDNIKQ	8	914.5185
SEQ ID NO:11	GKLDLVKPO	9	996.5967
SEQ ID NO:12	GNPEDEFE	8	935.3508
SEQ ID NO:13	HFNLDSH	7	868.3828
SEQ ID NO:14	HVREGDIV	8	923.4824
SEQ ID NO:15	IDRPSQA	7	785.4031
SEQ ID NO:16	IDRPSQAD	8	900.4301
SEQ ID NO:17	IKEGDMVAM	9	992.4671
SEQ ID NO:18	KEGGVLPGIK	10	996.5967
SEQ ID NO:19	KLDLVKPO	8	939.5753
SEQ ID NO:20	KN(+0.98)GMMAPH	8	885.3837
SEQ ID NO:21	KNAIYTPH	8	942.4923
SEQ ID NO:22	KNGMMAPH	8	884.3997
SEQ ID NO:23	LNDKFKVL	8	975.5753
SEQ ID NO:24	MRNPLAGK	8	885.4854
SEQ ID NO:25	N(+0.98)YRNIFK	7	954.4923
SEQ ID NO:26	NAIYTPH	7	814.3973
SEQ ID NO:27	NIDRPSQA	8	899.4460
SEQ ID NO:28	NNYNLPIL	8	959.5076
SEQ ID NO:29	NQDDFRGS	8	937.3889
SEQ ID NO:30	NQLDMSPR	8	959.4495
SEQ ID NO:31	NRDDMRE	7	934.3926
SEQ ID NO:32	NYRNIFK	7	953.5083
SEQ ID NO:33	PDRHQKL	7	892.4879
SEQ ID NO:34	PHQEFPO	7	881.4031
SEQ ID NO:35	QADIFNPR	8	959.4824
SEQ ID NO:36	QHRWOSQ	7	968.4576
SEQ ID NO:37	QNQSPRYS	8	978.4519
SEQ ID NO:38	RNIFKGF	7	880.4919
SEQ ID NO:39	RNPLAGK	7	754.4449
SEQ ID NO:40	RNPLAGKV	8	853.5134
SEQ ID NO:41	RQNIDRPS	8	984.5101
SEQ ID NO:42	SAERGFLY	8	941.4606

SEQ ID NO:43	SEDHTAKF	8	933.4192
SEQ ID NO:44	SETARKIQ	8	931.5087
SEQ ID NO:45	SETVKRLQ	8	959.5400
SEQ ID NO:46	SKGYAVASAS	10	939.4661
SEQ ID NO:47	SQQTRYE	7	910.4144
SEQ ID NO:48	SRRFHLA	7	885.4933
SEQ ID NO:49	TELAHKL	7	810.4600
SEQ ID NO:50	TKETGQAIQ	9	974.5032
SEQ ID NO:51	VFDGELRE	8	963.4661
SEQ ID NO:52	VKEPVFSF	8	951.5065
SEQ ID NO:53	VREPVFSF	8	979.5127
SEQ ID NO:54	VVRYTIQ	7	877.5021

### Ejemplo 3 – Actividad antiinflamatoria de los péptidos de la invención.

Una vez sintetizados los péptidos bioaccesibles, las células mononucleares de sangre periférica fueron tratadas con varias concentraciones, siendo la mayor de ellas de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Para activar las células, éstas fueron tratadas previamente con lipopolisacárido (LPS) bacteriano a 1  $\mu\text{g/mL}$ , pasada 1 hora se adicionaron los tratamientos durante 24 horas. Para evaluar la capacidad anti-inflamatoria e inmunomoduladora de los péptidos de la invención se determinó la expresión génica de moléculas pro-inflamatorias ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ), moléculas anti-inflamatorias (IL-10), receptores de quimiotaxis (CCR2), marcadores de polarización de macrófagos (CCR7, iNOS) y marcador de activación linfocitaria citotóxica (CD8). En la **Tabla 3** se muestran los resultados obtenidos. El símbolo “+” indica que a una o varias concentraciones testadas el péptido mostró diferencias significativas con el control positivo (células + LPS). Por el contrario, aquellas con el símbolo “-” indican que no se detectaron diferencias significativas.

15

**Tabla 3.** Efecto de los péptidos de la invención sobre la expresión de genes relacionados con la inflamación y la inmunomodulación.

	$\text{TNF}\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$	IL-10	CCR2	CCR7	iNOS	CD8
SEQ ID NO: 1	+	+	-	-	+	+	+	+
SEQ ID NO: 2	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 3	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 4	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 5	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 6	+	+	+	-	-	+	+	-

# ES 2 968 498 A1

SEQ ID NO: 7	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 8	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 9	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 10	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 11	-	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 12	+	+	-	-	-	-	+	+
SEQ ID NO: 13	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 14	+	-	+	-	+	+	-	+
SEQ ID NO: 15	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 16	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 17	+	+	-	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 18	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 19	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 20	+	-	-	+	+	-	+	+
SEQ ID NO: 21	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 22	+	+	-	-	+	-	-	-
SEQ ID NO: 23	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 24	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 25	+	+	+	-	-	+	+	-
SEQ ID NO: 26	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 27	+	+	-	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 28	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 29	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 30	+	+	-	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 31	+	+	-	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 32	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 33	+	+	-	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 34	+	-	+	-	-	-	+	+
SEQ ID NO: 35	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 36	+	+	-	-	+	+	+	+
SEQ ID NO: 37	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 38	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 39	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 40	+	+	+	-	-	+	+	-
SEQ ID NO: 41	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 42	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 43	+	+	+	-	+	+	+	-



SEQ ID NO: 44	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 45	+	+	-	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 46	+	+	+	+	+	+	+	+
SEQ ID NO: 47	+	+	-	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 48	+	+	-	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 49	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 50	+	+	-	-	+	+	+	+
SEQ ID NO: 51	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 52	+	+	-	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 53	+	+	+	-	+	+	+	-
SEQ ID NO: 54	+	+	+	+	-	-	+	-

Finalmente, podemos establecer que los péptidos de la invención identificados presentan actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora *in vitro* a través del estudio de la expresión de diversos genes relacionados con la inflamación, la quimiotaxis y la

5 activación de monocitos y linfocitos.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un péptido (i) que presenta actividad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora, y (ii) es absorbido por el epitelio intestinal de forma intacta, que  
5 comprende
  - a) Hidrolizar un extracto proteico procedente de una semilla con una endoproteasa para obtener un primer hidrolizado proteico,
  - b) Filtrar el primer hidrolizado proteico a través de un soporte de membrana semipermeable que comprende células epiteliales intestinales, para obtener un  
10 segundo hidrolizado proteico,
  - c) Comparar el primer y segundo hidrolizado proteico para seleccionar aquellos péptidos presentes en ambos hidrolizados, y
  - d) Evaluar la capacidad de los péptidos presentes en ambos hidrolizados de inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias.  
15
2. Método según la reivindicación 2, en el que la semilla es una semilla de leguminosa.
3. Método según la reivindicación 3, en el que la semilla de leguminosa es una semilla de *Cannabis sativa* L.  
20
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima es una enzima de amplio espectro.
5. Método según la reivindicación 4, en donde la enzima de amplio espectro es  
25 subtilisina.
6. Un péptido obtenido por un método según la reivindicación 5, caracterizado porque comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en  
30 AMRNPLAGK (SEQ ID NO: 1), DDNPRRF (SEQ ID NO: 2), DDRNSIIR (SEQ ID NO: 3), DESYRQQ (SEQ ID NO: 4), DRNSIIR (SEQ ID NO: 5), DSETVKRL (SEQ ID NO: 6), GFEWIAVK (SEQ ID NO: 7), GFEWVSFK (SEQ ID NO: 8), GKDNIIK (SEQ ID NO: 9), GKDNIIKQ (SEQ ID NO: 10), GKLDLVKPQ (SEQ ID NO: 11), GNPEDFEFE (SEQ ID NO: 12), HFNLD SH (SEQ ID NO: 13), HVREGDIV (SEQ ID NO: 14), IDRPSQA (SEQ ID NO: 15), IDRPSQAD (SEQ ID NO: 16), IKEGDMVAM (SEQ ID NO: 17), KEGGVLP GIK (SEQ  
35 ID NO: 18), KLDLVKPQ (SEQ ID NO: 19), KN(+0.98)GMMAPH (SEQ ID NO: 20),

- KNAIYTPH (SEQ ID NO: 21), KNGMMAPH (SEQ ID NO: 22), LNDKFKVL (SEQ ID NO: 23), MRNPLAGK (SEQ ID NO: 24), N(+0.98)YRNIFK (SEQ ID NO: 25), NAIYTPH (SEQ ID NO: 26), NIDRPSQA (SEQ ID NO: 27), NNYNLPIL (SEQ ID NO: 28), NQDDFRGS (SEQ ID NO: 29), NQLDMSPR (SEQ ID NO: 30), NRDDMRE (SEQ ID NO: 31),  
5 NYRNIFK (SEQ ID NO: 32), PDRHQKL (SEQ ID NO: 33), PHQEFPPQ (SEQ ID NO: 34), QADIFNPR (SEQ ID NO: 35), QHRWQSQ (SEQ ID NO: 36), QNQSPRYS (SEQ ID NO: 37), RNIFKGF (SEQ ID NO: 38), RNPLAGK (SEQ ID NO: 39), RNPLAGKV (SEQ ID NO: 40), RQNIDRPS (SEQ ID NO: 41), SAERGFLY (SEQ ID NO: 42), SEDHTAKF (SEQ ID NO: 43), SETARKIQ (SEQ ID NO: 44), SETVKRLQ (SEQ ID NO: 45), SKGYAVASAS  
10 (SEQ ID NO: 46), SQQTRYE (SEQ ID NO: 47), SRRFHLA (SEQ ID NO: 48), TELAHKL (SEQ ID NO: 49), TKETGQAIQ (SEQ ID NO: 50), VFDGELRE (SEQ ID NO: 51), VKEPVFSF (SEQ ID NO: 52), VREPVFSF (SEQ ID NO: 53), VVRYTIQ (SEQ ID NO: 54).
- 15 7. Péptido según la reivindicación 6, en donde el péptido comprende un marcador en uno de sus extremos.
8. Péptido según la reivindicación 7, en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste en c-myc, FLAG, HA, cadena de histidinas, GST, biotina, VSV-G, HSVtk, V5,  
20 biotina, avidina, estreptavidina, proteína de unión a maltosa y una proteína fluorescente.
9. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el péptido comprende un péptido señal en uno de sus extremos.
- 25 10. Secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
11. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 10.
- 30 12. Una célula que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 10, o un vector según la reivindicación 11.
13. Un extracto peptídico que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.

14. Una composición que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 10, un vector según la reivindicación 11, una célula según la reivindicación 12 y/o un extracto peptídico según la reivindicación 13.

5

15. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 10, un vector según la reivindicación 11, una célula según la reivindicación 12 y/o un extracto peptídico según la reivindicación 13, o una composición según la reivindicación 14, para su uso como medicamento.

10

16. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 10, un vector según la reivindicación 11, una célula según la reivindicación 12 y/o un extracto peptídico según la reivindicación 13, o una composición según la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

15

17. Un péptido, una secuencia de nucleótidos, un vector, una célula, un extracto peptídico, o una composición, para su uso según la reivindicación 16, en donde la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad autoinmune, cáncer, aterosclerosis, artrosis, artritis, diabetes, obesidad, síndrome metabólico, asma, enfermedad de Crohn, Alzheimer, hipertensión y dermatitis.

20

18. Un péptido, una secuencia de nucleótidos, un vector, una célula, un extracto peptídico, o una composición, para su uso según la reivindicación 17, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica, enfermedades inflamatorias, y trombocitopenia, enfermedades inmunes agudas o crónicas asociadas con el trasplante de órganos y alergias.

25

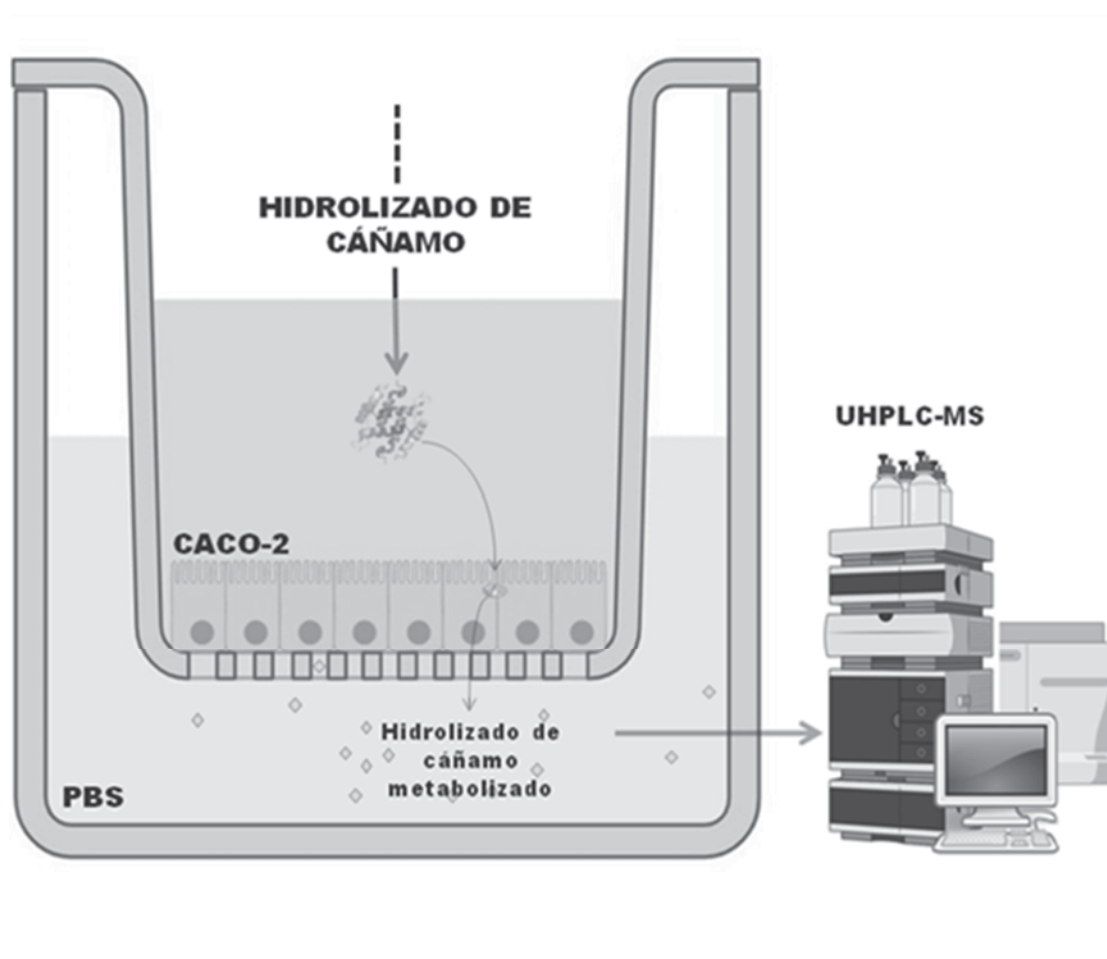


Fig. 1

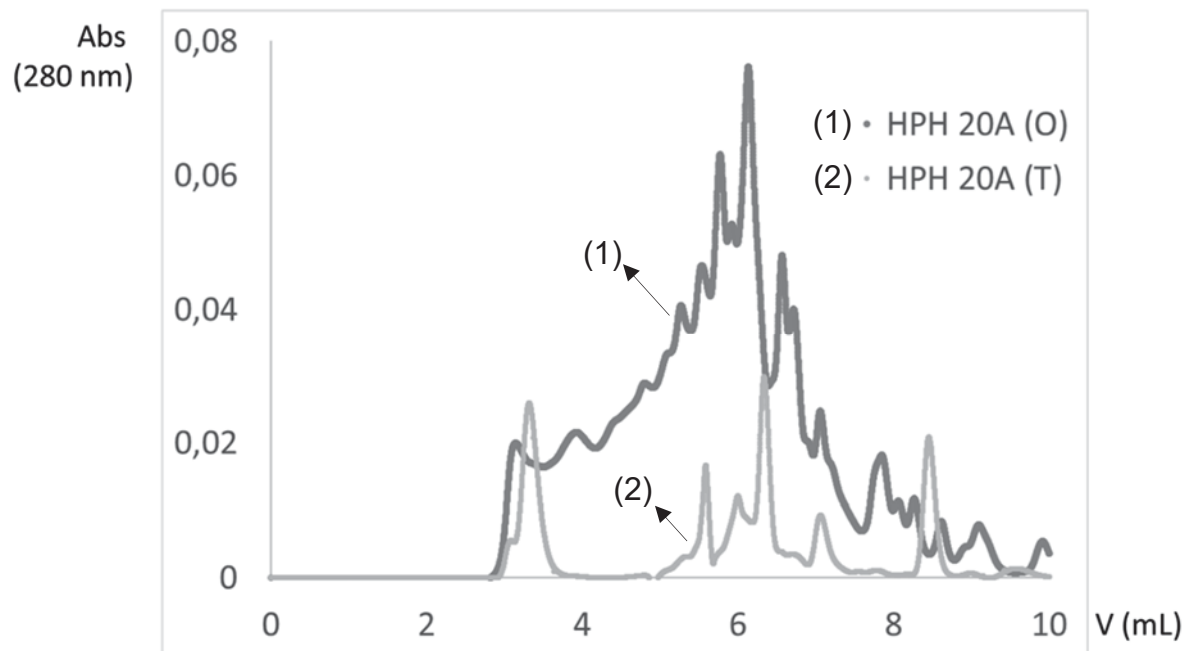


FIG. 2



- ②① N.º solicitud: 202230873  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.10.2022  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CRUZ-CHAMORRO IVAN et al. "Hempseed (Cannabis sativa) Peptides WVSPLAGRT and IGFLIIWV Exert Anti-inflammatory Activity in the LPS-Stimulated Human Hepatic Cell Line.", Journal of agricultural and food chemistry, (2022), Vol. 70, Páginas 577 - 583, ISSN 1520-5118 (Electronic), <DOI: doi: 10.1021/acs.jafc.1c07520 pubmed:35007086>. todo el documento.	1-5
A		6-18
X	BOLLATI C, CRUZ-CHAMORRO et al., "Investigation of the intestinal trans-epithelial transport and antioxidant activity of two hempseed peptides WVSPLAGRT (H2) and IGFLIIWV (H3)." Food Res Int., (2022), Vol:152, Pág:110720, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110720. Epub 2021 Sep 22. PMID: 35181114.> todo el documento	1-5
A		6-18
A	LI J, BOLLATI C, et al., "Hempseed (Cannabis sativa) Peptide H3 (IGFLIIWV) Exerts Cholesterol-Lowering Effects in Human Hepatic Cell Line." Nutrients, (2022), Vol:14, Pag:1804. doi: 10.3390/nu14091804. PMID: 35565772; PMCID: PMC9101684.>todo el documento	1-18

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1-18 (todas parcialmente)

Fecha de realización del informe  
19.07.2023

Examinador  
M. Hernández Cuéllar

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K7/00** (2006.01)**C07K1/14** (2006.01)**A61P29/00** (2006.01)

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

C07K, A61P

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

EPODOC, WPI, EBI-EMBL SEQUENCE DATABASES, REGISTRY, CAS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE,