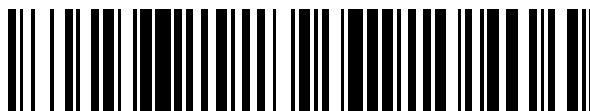


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 548**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2008 E 08805580 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2152881**

54 Título: **Péptidos RumC que presentan una actividad antimicrobiana**

30 Prioridad:

29.05.2007 FR 0703789

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

20.05.2014

73 Titular/es:

**ADISEO FRANCE S.A.S. (100.0%)
IMMEUBLE ANTONY PARC II 10, PLACE DU
GÉNÉRAL DE GAULLE
92160 ANTONY, FR**

72 Inventor/es:

**CROST, EMMANUELLE;
FONS, MICHEL y
GERAERT, PIERRE-ANDRÉ**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 461 548 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos RumC que presentan una actividad antimicrobiana.

- 5 La invención se refiere a los péptidos RumC1, RumC2 y RumC3 que presentan una actividad antimicrobiana, así como a los genes que codifican para estos péptidos y aislados de *Ruminococcus gnavus* E1.

10 Algunas cepas bacterianas tienen la capacidad de liberar unas sustancias que tienen un efecto bacterioestático o bactericida sobre sus competidores. Estas sustancias antimicrobianas pueden ser de naturaleza orgánica, por ejemplo ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno (Ross *et al.*, Int. J. Food Microbiol. 79, 3-16, 2002), o de naturaleza peptídica. Se distinguen, además, los péptidos antimicrobianos sintetizados por vía enzimática que forman la clase de los antibióticos (Mootz *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol. 1, 543-551, 1997; Keating *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 598-606, 1999), y los péptidos producidos por la vía ribosómica que forman la clase de las bacteriocinas (Jacob *et al.*, Ann. Inst. Pasteur (Paris) 84, 222-224, 1953).

15 Las bacteriocinas suscitan un interés creciente en el mundo de la investigación y de la industria; podría proporcionar soluciones alternativas a la utilización de antibióticos, en particular en la crianza (Luchansky, Antonie Van Leeuwenhoek 76, 335, 1999; O'Sullivan *et al.*, Biochimie 84, 593-604, 2002).

20 Numerosos sistemas de expresión heterólogos de estas bacteriocinas se han desarrollado hace algunos años. En particular, Morisset *et al.* (Morisset *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 70, 4672-4680, 2004) han expresado unas variantes de la mesentricina Y105, bacteriocina de clase IIa producida por *Leuconostoc mesenteroides sub. esp. mensenteroides* Y105, en *Leuconostoc mesenteroides sub. esp. dextranicum* DSM20484. Asimismo, Flynn *et al.* (Microbiol., 148, 973-984, 2002) han realizado la expresión de ABP-118, bacteriocina de clase IIb producida originalmente por *Lactobacillus salivarius sub. esp. salivarius* UCC118, en los hospedantes *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Bacillus cereus*.

30 Además, se realizaron varios ensayos para expresar unas bacteriocinas en la bacteria *Escherichia coli* (McCormick *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 4757-4766, 1998; Garneau *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 69, 1352-1358, 2003; Biet *et al.*, Microbiol., 144, 2845-2854, 1998; Miller *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 14-20, 1998; Richard *et al.*, J. Bacteriol., 186, 4276-4284, 2004; Kloche *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 67:532-538, 2005), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Schoeman *et al.*, Yeast, 15, 647-656, 1999; Van Reenen *et al.*, Int. J. Food Microbiol., 81, 29-40, 2003) y en unas bacterias lácticas (Rodríguez *et al.*, Int. J. Food Microbiol., 80, 101-116, 2003).

35 Por lo tanto, se realizaron numerosos trabajos para la identificación de nuevas bacteriocinas y para la producción de estas bacteriocinas.

40 El ecosistema digestivo está constituido por una microflora abundante y muy compleja que agrupa unas bacterias, unas levaduras y unos *Archaea*. Esta microbiota es esencialmente anaeróbica y se encuentran principalmente las bacterias de los géneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* y *Fusobacterium* (Suau *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 65, 4799-4807, 1999). La microflora tiene un impacto importante sobre la salud del hospedante. Está en particular implicada en la toxificación y la destoxificación de compuestos metabólicos procedentes de la alimentación (Hughes y Rowland Microbial Ecology Health Disease 2, 179-185, 2000). Es asimismo capaz de modular la expresión de funciones enterocitarias (Bry *et al.*, Science 273,1380-1383, 1996; Hooper *et al.*, Science 291, 881-884, 2001). Por último, desempeña un papel primordial en la protección del hospedante contra la invasión por bacterias exógenas potencialmente patógenas (Ducluzeau *et al.*, Microbial Ecology and Intestinal Infections, 1988; Fons *et al.*, Microbial Ecology in Health and Disease 2, 240-246, 2000).

50 Entre los patógenos intestinales conocidos, se encuentra *Clostridium perfringens*, bacteria Gram positiva, anaerobia estricta, capaz de esporular y muy extendida en el ambiente. Este patógeno puede proceder de la alimentación, pero puede estar también presente en baja concentración en el intestino y comenzar a proliferarse y a segregar unas toxinas bajo el efecto de una tensión. Las cepas de *Clostridium perfringens* están clasificadas en 5 toxinotipos en función de las toxinas que producen (Petit *et al.*, Trends Microbiol. 7, 104-110, 1999). Las cepas de *C. perfringens* de tipo A son responsables de enfermedades gastrointestinales en el ser humano. En 1997, ses registraron en los Estados Unidos más de 245000 casos de infecciones con *C. perfringens*. Esto condujo a la hospitalización de 41 personas, de las cuales 7 no han sobrevivido (Mead *et al.*, Emerg. Infect. Dis. 5, 607-625, 1999). Las cepas de *C. perfringens* de tipo A y C pueden ser, respectivamente, el origen de enteritis necrótica en las aves de corral y los cerdos. En las aves de corral, la enteritis necrótica es una patología aguda, de evolución rápida cuya mortalidad puede alcanzar del 1 al 2% por día. Además de su incidencia sobre el bienestar de los animales, esta patología puede por lo tanto tener una influencia económica nada despreciable. Hasta 1999, esta enfermedad era bien controlada mediante el uso de antibióticos como factores de crecimiento. Pero la unión Europea ha prohibido su uso en la alimentación animal por temor a seleccionar bacterias resistentes y por lo tanto ver disminuir la eficacia de los antibióticos en el ser humano. A partir de esta prohibición, la enteritis necrótica provocada por *Clostridium perfringens* en las aves de corral y en cerdos ya no está controlada en Europa. El número de casos declarados en la Red Nacional de Observaciones Epidemiológicas en Avicultura (RNOEA) (AFSSA Ploufragan) aumentó considerablemente en 1999 y 2000 (Valancony, Bulletin des GTV 12, 9-12, 2001).

En la actualidad, la búsqueda de soluciones alternativas para controlar y tratar esta enfermedad es por lo tanto de principal importancia.

5 *Ruminococcus gnavus* es una bacteria anaeróbica estricta que pertenece a la familia de las *Lachnospiraceae*, del orden de los *Clostridiales*. Dabard *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., 67, 4111-4118, 2001) han mostrado que la cepa *Ruminococcus gnavus* E1, aislada de la flora dominante del ser humano, es capaz de producir una sustancia antimicrobiana, denominada ruminococcina A o RumA, que se acumula en el sobrenadante de cultivo. Se trata de una bacteriocina que pertenece a la familia de los lantibióticos, activa contra diferentes cepas de *Clostridium sp.* patógenas. Gomez *et al.* (J. Bacteriol., 184, 18-28, 2002) han mostrado que la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de la ruminococcina A es inducida en presencia de tripsina. Los mismos autores muestran también que ciertas enzimas digestivas podrían inhibir la inducción de la producción de RumA.

Los inventores se han interesado, por lo tanto, en otras bacteriocinas.

La presente invención se refiere a los péptidos RumC1, RumC2 y RuC3 que presentan una actividad antibacteriana contra *Clostridium perfringens*, así como a los genes que codifican para estos péptidos.

Descripción de las secuencias

SEC ID nº 1: Secuencia peptídica conservada de los péptidos RumC de *Ruminococcus gnavus* E1

SEC ID nº 3: Secuencia peptídica de los péptidos RumC de *Ruminococcus gnavus* E1 determinada experimentalmente mediante el método de degradación de Edman

SEC ID nº 4: Secuencia peptídica del péptido RumC1 de *Ruminococcus gnavus* E1 deducida de SEC ID nº 7

SEC ID nº 5: Secuencia peptídica del péptido RumC2 de *Ruminococcus gnavus* E1 deducida de SEC ID nº 8

SEC ID nº 6: Secuencia peptídica del péptido RumC3 de *Ruminococcus gnavus* E1 deducida de SEC ID nº 9

SEC ID nº 7: Secuencia nucleotídica del gen rumC1 de *Ruminococcus gnavus* E1

SEC ID nº 8: Secuencia nucleotídica del gen rumC2 de *Ruminococcus gnavus* E1

SEC ID nº 9: Secuencia nucleotídica del gen rumC3 de *Ruminococcus gnavus* E1

SEC ID nº 10, 11 y 12: Secuencias peptídicas determinadas experimentalmente

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un péptido que tiene una actividad antimicrobiana y más específicamente contra las cepas de *Clostridium perfringens* y caracterizado porque comprende un péptido seleccionado de entre los péptidos siguientes: el péptido de la secuencia SEC ID nº 1, un péptido que comprende un péptido que presenta por lo menos el 80% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 1, el péptido de la secuencia SEC ID nº 2, y un péptido que comprende un péptido que presenta por lo menos el 80% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 2. Según un modo de realización de la presente invención, este péptido comprende además el péptido de la secuencia SEC ID nº 3. Según otro modo de realización de la presente invención, este péptido comprende un péptido seleccionado de entre los péptidos de secuencias SEC ID nº 4, 5 o 6.

La presente invención se refiere asimismo a un polinucleótido que codifica para una actividad antimicrobiana y más específicamente contra las cepas de *Clostridium perfringens* caracterizado porque comprende un polinucleótido seleccionado de entre el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9, un polinucleótido que se hibrida en condiciones de media a fuerte astringencia al polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9, y un polinucleótido que codifica para un polipéptido, tal como el definido anteriormente.

La presente invención se refiere también a un casete de expresión caracterizado porque comprende, en el sentido de la transcripción, un promotor funcional en un organismo hospedante, un polinucleótido tal como el definido anteriormente y una secuencia terminadora en el mismo organismo hospedante.

La presente invención se refiere también a un vector que comprende un polinucleótido tal como el definido anteriormente y/o un casete de expresión tal como el definido anteriormente.

La presente invención se refiere asimismo a un organismo hospedante transformado con un polinucleótido, tal como el definido anteriormente, un casete de expresión tal como el definido anteriormente y/o un vector tal como el definido anteriormente.

5 La presente invención se refiere a una cepa de *Ruminococcus gnavus* depositada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75015 París) el 19 de diciembre de 2006 bajo el número CNCM I-3705, así como a una cepa bacteriana en estado aislado no modificada genéticamente, que produce un péptido tal como el definido anteriormente.

10 La presente invención se refiere a una mezcla proteica o mosto de fermentación susceptible de ser obtenido por un organismo hospedante o por la cepa anteriormente definida, y más particularmente por un procedimiento de preparación que comprende las etapas de cultivo de la cepa citada anteriormente o de un organismo hospedante transformado con un polinucleótido, un casete de expresión y/o un vector según la invención, en condiciones de inducción de la expresión del péptido, y la recuperación del sobrenadante de cultivo que comprende el péptido, opcionalmente la ruptura de células y la purificación del extracto celular.

15 La presente invención se refiere asimismo a una composición que comprende un péptido tal como el definido anteriormente, un organismo hospedante tal como el definido anteriormente, una cepa tal como el definido anteriormente, un mosto de fermentación de un organismo hospedante tal como el definido anteriormente o un mosto de fermentación de una cepa tal como la definida anteriormente. Según un modo de realización de la presente invención, la composición se presenta en forma líquida o en forma de polvo.

20 La presente invención se refiere asimismo a un aditivo nutricional que comprende un péptido tal como el definido anteriormente, un organismo hospedante tal como el definido anteriormente, una cepa tal como la definida anteriormente, un mosto de fermentación de un organismo hospedante tal como el definido anteriormente o un mosto de fermentación tal

25 La presente invención se refiere asimismo a un aditivo nutricional que comprende un péptido tal como el definido anteriormente, un organismo hospedante tal como el definido anteriormente, una cepa tal como la definida anteriormente, un mosto de fermentación de un organismo hospedante tal como el definido anteriormente o un mosto de fermentación tal como el definido anteriormente. Según un modo de realización de la presente invención, el aditivo se presenta en forma líquida o en forma de polvo.

30 La presente invención se refiere asimismo a un alimento para animales caracterizado porque comprende una base nutricional para animales y un aditivo nutricional tal como el definido anteriormente.

35 La presente invención se refiere asimismo a la utilización de un péptido tal como el definido anteriormente, de un organismo hospedante tal como el definido anteriormente, de una cepa tal como la definida anteriormente, de un mosto de fermentación de un organismo hospedante tal como el definido anteriormente o de un mosto de fermentación de una cepa tal como la definida anteriormente, para la fabricación de un medicamento, de un aditivo nutricional o de un alimento para animales. Según un modo de realización de la presente invención, este medicamento o este aditivo nutricional se destina a prevenir o tratar la enteritis necrótica en las aves de corral o en los cerdos. Según otro modo de realización de la presente invención, este medicamento o este aditivo nutricional está destinado a prevenir o tratar las enfermedades gastrointestinales en el ser humano.

45 Por último, la presente invención se refiere asimismo a la utilización no terapéutica de un péptido tal como el definido anteriormente para tratar los animales. Según un modo de realización de la presente invención, el péptido procede de una cepa endógena o de una cepa exógena del animal. Según otro modo de realización de la presente invención, el péptido procede de una cepa endógena del animal y se favorece la producción del péptido por dicha cepa endógena. Según otro modo más de realización de la presente invención, el péptido procede de una cepa endógena del animal y se favorece el crecimiento de dicha cepa endógena.

50 Péptidos

La presente invención se refiere por lo tanto a unos péptidos que tienen una actividad antimicrobiana. Preferentemente, estos péptidos están aislados de

55 75015 París) el 19 de diciembre de 2006, bajo el número CNCM I-3705, es decir la cepa LEM 9-17.

60 Se entiende por "actividad antimicrobiana" la capacidad para inhibir el crecimiento o el desarrollo de bacterias objetivo o la capacidad para eliminar unas bacterias objetivo en particular, la actividad microbiana según la presente invención se dirige contra las cepas de *Clostridium perfringens*. Las técnicas de medición de la actividad antimicrobiana son conocidas por el experto en la materia. La actividad antimicrobiana está demostrada en la presente invención mediante un ensayo de actividad sobre la cepa *Clostridium perfringens* CpA cultivada sobre un medio agar. La muestra que contiene uno de los péptidos de la invención se deposita en unos pocillos formados en el medio agar. La actividad antimicrobiana se demuestra cuando se forma un halo de inhibición alrededor del pocillo.

65 Las secuencias peptídicas de los péptidos RumC1, RumC2 y RumC3 de *Ruminococcus gnavus* E1 están respectivamente representadas por las secuencias SEC ID nº 4, SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6. Estas secuencias son

respectivamente deducidas de las secuencias nucleotídicas de los genes *rumC1*, *rumC2* y *rumC3* representadas respectivamente por las secuencias SEC ID nº 7, SEC ID nº 8 y SEC ID nº 9.

5 La invención se refiere también a unos fragmentos de estos péptidos RumC1, RumC2 y RumC3 de *Ruminococcus gnavus* E1 que tienen una actividad antimicrobiana. El término "fragmento" de un péptido designa un péptido que comprende una parte, pero no la totalidad, del péptido del cual deriva. La invención se refiere así a los péptidos de las secuencias SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3.

10 Estos fragmentos conservan su actividad antimicrobiana. La invención se refiere por lo tanto a los fragmentos biológicamente activos. El término "fragmento biológicamente activo" designa un fragmento de un polipéptido que conserva la función del polipéptido del cual deriva.

15 La invención se refiere asimismo a unos péptidos que tienen una actividad antimicrobiana y que presenta por lo menos el 80%, 90%, 95%, 98% y preferentemente por lo menos el 99% de aminoácidos idénticos con cualquiera de los péptidos de las secuencias SEC ID nº 1, 2 o 3.

20 La invención se refiere también a unos péptidos que tienen una actividad antimicrobiana y que presentan por lo menos el 80%, 90%, 95%, 98% y preferentemente por lo menos el 99% de aminoácidos idénticos con cualquiera de los péptidos de las secuencias SEC ID nº 1, 2 o 3.

Los métodos de preparación de los péptidos de secuencias SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3 son conocidos por el experto en la materia.

25 Los péptidos RumC son segregados (o liberados) por las bacterias en el entorno extracelular. Es posible que cualquiera de los péptidos de secuencias SEC ID nº 4, 5 y/o 6 comprenda un péptido señal de un número determinado de aminoácidos. En este caso, la invención se refiere también al péptido maduro obtenido después de la escisión del péptido señal. Según un modo de realización de la presente invención, dicha invención se refiere a los péptidos cuyas secuencias están comprendidas entre la posición 20 y la posición 63 de las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6.

30 En otro modo de realización, el péptido señal potencial del péptido de la SEC ID nº 4, 5 o 6 puede estar sustituido con un péptido señal heterólogo para realizar la expresión y la secreción de este péptido por un organismo hospedante heterólogo.

35 La invención tiene asimismo por objeto un péptido que tiene una actividad antimicrobiana y que presenta por lo menos el 80% de identidad con el péptido de la SEC ID nº 4, 5 o 6. Según un modo de realización de la presente invención, este péptido está aislado a partir de una cepa de *Ruminococcus gnavus*. Según otro modo de realización de la presente invención, este péptido se aísla a partir de otras cepas de *Ruminococcus* o de otras bacterias. Alternativamente, este péptido se puede obtener por síntesis química.

40 La invención tiene por objeto un péptido que presenta por lo menos el 90%, 95%, 98% y preferentemente el 99% de aminoácidos idénticos con cualquiera de los péptidos de las secuencias SEC ID nº 4, 5 o 6.

45 Por "aminoácidos idénticos" se entienden unos aminoácidos constantes o invariables entre dos secuencias. Estos péptidos pueden presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto a los péptidos representados por las secuencias SEC ID nº 4, 5 o 6. Se consideran aminoácidos invariables entre dos secuencias, unos aminoácidos modificados después de la transcripción, por ejemplo deshidratación, formación de puentes monosulfuros, lantioninas, etc.

50 La invención tiene también por objeto unos péptidos que presentan por lo menos el 80%, el 90%, el 95%, el 98% y preferentemente por lo menos el 99% de similitud con cualquiera de los péptidos de las secuencias SEC ID nº 4, 5 o 6.

55 Por "similitud" se entiende la medición de la semejanza entre secuencias proteicas o nucleicas. Estos péptidos pueden presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto a los péptidos representados por las secuencias SEC ID nº 4, 5 o 6. El grado de similitud entre dos secuencias, cuantificado por un resultado, se basa en el porcentaje de identidades y/o de sustituciones conservadoras de las secuencias.

60 Los métodos de medición y de identificación del grado de identidad y del grado de similitud entre polipéptidos son conocidos por el experto en la materia. La alineación de las secuencias se realiza por ejemplo por medio del Vector NTi 9.1.0, programa de alineación AlignX (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>) o utilizando la herramienta CLUSTAW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

65 Los péptidos según la invención pueden ser aislados o purificados de su entorno natural. Los péptidos pueden ser preparados mediante diferentes procedimientos. Estos procedimientos son en particular la purificación a partir de

fuentes naturales tales como unas bacterias que expresan naturalmente estos péptidos, la producción de péptidos recombinantes por unas células hospedantes apropiadas y su purificación ulterior, la producción por síntesis química o, por último, una combinación de estos diferentes enfoques. Así, los péptidos de las secuencias SEC ID nº 1 a 6 de la presente invención se pueden aislar a partir de la cepa de *Ruminococcus gnavus* depositada en la CNCM el 19 de diciembre de 2006 bajo el número CNCM I-3705. En otro modo de realización, los péptidos de la presente invención se aíslan a partir de organismos hospedantes recombinantes que expresan un péptido RumC según la invención o un fragmento del péptido RumC que presenta una actividad antimicrobiana.

La invención tiene asimismo por objeto unas proteínas de fusión, unas proteínas recombinantes o unas proteínas quiméricas que comprenden los péptidos según la invención.

Los péptidos de la invención pueden ser aislados a partir de contenido cecal de rata monoxénica que aloja la cepa *Ruminococcus gnavus* E1 y a partir de una cepa de *Ruminococcus gnavus* mutante, más precisamente la cepa de *Ruminococcus gnavus* depositada en la CNCM el 19 de diciembre de 2006 bajo el número CNCM I-3705. Estos péptidos presentan una actividad antimicrobiana demostrada por un ensayo de actividad sobre *Clostridium perfringens*.

La espectrometría de masa ha permitido determinar la masa molecular aproximativa del péptido RumC según la invención. La masa molecular se sitúa entre 4000 y 4600 Da, más precisamente entre 4100 y 4500 Da.

Según un modo de realización de la presente invención, el péptido es adecuado para una utilización en nutrición o en farmacéutica, por ejemplo una utilización en nutrición animal.

Se entiende por "péptido adecuado para la utilización en la nutrición o uso farmacéutico" un péptido cuyas características son tales que son convenientes para la nutrición o uso farmacéutico. Las características esenciales para una utilización en nutrición o en farmacia son en particular el pH al que el péptido puede resistir. En efecto, el pH del sistema digestivo de los animales y del ser humano es ácido y es por lo tanto esencial que el péptido sea resistente a este pH. Otra característica esencial para una utilización en nutrición es la temperatura a la que la sustancia antimicrobiana es activa. En efecto, el procesamiento de sustancia antimicrobiana en un medicamento, un aditivo nutricional o un alimento para animales, por ejemplo, implica unos tratamientos y una temperatura superior a la temperatura ambiente. La actividad de los antimicrobianos utilizados debe ser estable en las condiciones de los procedimientos, en particular las condiciones de temperaturas.

Según un modo de realización de la presente invención, el péptido, o una mezcla de péptidos según la invención, presenta una actividad antimicrobiana a pH neutro y conserva su actividad antimicrobiana a un pH ácido, por ejemplo inferior a 7, preferentemente inferior a 4,4.

Según un modo de realización de la presente invención, el péptido, o una mezcla de péptidos según la invención, presenta una actividad antimicrobiana a 37°C y conserva esta actividad a unas temperaturas inferiores y superiores a la temperatura ambiente, por ejemplo superior a 50°C.

La invención se refiere también a un péptido que presenta una actividad antimicrobiana, aislado a partir de contenido cecal de rata monoxénica o a partir de una cepa de *Ruminococcus gnavus* mutante, que presenta una actividad contra las cepas de *Clostridium perfringens*, que tiene una masa molecular comprendida entre 5000 y 4600 Da tal como se determina mediante espectrometría de masas y que es resistente a un pH inferior o igual a 7. Según un modo de realización, el péptido comprende la secuencia SEC ID nº 1 y/o la secuencia SEC ID nº 2. Según otro modo de realización, comprende además el péptido de la secuencia SEC ID nº 3. Ventajosamente, el péptido comprende un péptido seleccionado de entre cualquiera de los péptidos de secuencia SEC ID nº 4, 5 o 6.

La invención se refiere también a un péptido que presenta una actividad antimicrobiana, susceptible de ser obtenida a partir de una cepa de *Ruminococcus gnavus* mutante, por ejemplo la cepa de *Ruminococcus gnavus* depositada en la CNCM el 19 de diciembre de 2006 bajo el número CNCM I-3705. Según un modo de realización, el péptido presenta una actividad antimicrobiana frente a cepas de *Clostridium perfringens*. Según otro modo de realización, presenta una masa molecular comprendida entre 4000 y 4600 Da tal como se determina por espectrometría de masas, preferentemente comprendido entre 4100 y 4500 Da. Según otro modo de realización, el péptido presenta una actividad antimicrobiana a pH neutro y conserva su actividad antimicrobiana a un pH ácido, por ejemplo inferior a 7, preferentemente inferior a 4,4. Según un modo de realización, el péptido comprende la secuencia SEC ID nº 1 y/o la secuencia SEC ID nº 2. Según otro modo de realización, comprende además el péptido de la secuencia SEC ID nº 3. Ventajosamente, el péptido comprende un péptido seleccionado de entre cualquiera de los péptidos de secuencia SEC ID nº 4, 5 o 6.

La invención se refiere asimismo a un péptido que presenta un potencial antimicrobiano aislado a partir de contenido cecal de rata monoxénica, que corresponde al cromatograma de la figura 4A, obtenido a 214 nm por HPLC en fase inversa, que presenta una actividad contra diferentes cepas de *Clostridium perfringens*, en particular de toxinotipo A.

Polinucleótidos

La invención se refiere asimismo a unos polinucleótidos que codifican para una actividad antimicrobiana. Preferentemente, estos polinucleótidos codifican para una actividad antimicrobiana de *Ruminococcus*, y más preferentemente aún contra las cepas de *Clostridium perfringens*.

Según la presente invención, se entiende por "polinucleótido" una cadena nucleotídica monocatenaria o su complementaria que puede ser de tipo ADN o ARN, o una cadena nucleotídica bicatenaria que puede ser de tipo ADN complementario o genómico. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención son de tipo ADN, en particular ADN bicatenario. El término "polinucleótido" designa asimismo los polinucleótidos modificados.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden ser aislados o purificados de su entorno natural. Los polinucleótidos de la presente invención pueden también ser preparados por síntesis química o mediante técnicas clásicas de biología molecular, tales como las descritas por Sambrook, Fritsch y Maniatis, en su obra titulada "Molecular cloning: a laboratory manual", edición: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

La invención se refiere al polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9. La invención se refiere también al polinucleótido que se hibrida con el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9. La invención se refiere asimismo al polinucleótido que codifica para un péptido que presenta una actividad antimicrobiana tal como se ha definido anteriormente.

La invención se refiere asimismo a un polinucleótido que presenta por lo menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98% y preferentemente por lo menos el 99% de identidad con el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9. Este polinucleótido codifica una actividad antimicrobiana. Según un modo de realización, el polinucleótido codifica una actividad antimicrobiana frente a cepas de *Clostridium perfringens*.

Por "nucleótidos idénticos" se entienden unos nucleótidos constantes o invariables entre dos secuencias. Este polinucleótido puede presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un nucleótido con respecto al polinucleótido de referencia.

La invención se refiere asimismo a un polinucleótido que presenta por lo menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98% y preferentemente por lo menos el 99% de similitud con el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9. Este polinucleótido codifica una actividad antimicrobiana. Según un modo de realización, el polinucleótido codifica una actividad antimicrobiana frente a cepas de *Clostridium perfringens*.

Por "similitud" se entiende la medición de la semejanza entre secuencias proteicas o secuencias nucleicas. Este polinucleótido puede presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un nucleótido con respecto al polinucleótido de referencia. El grado de similitud entre dos secuencias, cuantificado por un resultado, se basa en el porcentaje de identidades y/o de sustituciones conservadoras de las secuencias.

Los métodos de medición y de identificación del grado de identidad y del grado de similitud entre las secuencias de ácidos nucleicos son conocidos por el experto en la materia. La alineación de las secuencias se realiza, por ejemplo mediante el Vector NTi 9.1.0, programa de alineación AlignX (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>) o utilizando la herramienta CLUSTAW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

La invención se refiere asimismo a polinucleótidos capaces de hibridarse de manera selectiva con el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9. Preferentemente, en el ámbito de la invención, la hibridación selectiva se efectúa en condiciones de media astringencia y preferentemente en condiciones de fuerte astringencia. Por "secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva", se entiende, según la invención, las secuencias que se hibridan con la secuencia de referencia a un nivel superior al ruido de fondo de manera significativa. El nivel de la señal generada por la interacción entre la secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva y las secuencias de referencia es generalmente 10 veces, preferentemente 100 veces más intensa que la de la interacción de las otras secuencias de ADN que generan el ruido de fondo. Las condiciones de hibridación astringentes que permiten una hibridación selectiva son conocidas por el experto en la materia. En general, la temperatura de hibridación y de lavado es inferior de por lo menos 5°C a T_m de la secuencia de referencia a un pH dado y para una fuerza iónica dada. Típicamente, la temperatura de hibridación es de por lo menos 30°C para un polinucleótido de 15 a 50 nucleótidos y de por lo menos 60°C para un polinucleótido de más de 50 nucleótidos. A título de ejemplo, la hibridación se realiza en el tampón siguiente: 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 12X SSC, 0,1% SDS, con media astringencia en un tampón 0,5X SSC, 0,1% SDS y con fuerte astringencia en un tampón 0,1X SSC, 0,1% SDS. La hibridación puede por supuesto efectuarse según otros métodos habituales conocidos por el experto en la materia (véase en particular Sambrook, Fritsch y Maniatis, en su obra titulada "Molecular cloning: a laboratory manual", edición: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Preferentemente, los polinucleótidos que se hibridan de manera selectiva con un polinucleótido de referencia conservan la función de la secuencia de referencia. En el presente caso, los polinucleótidos que se hibridan de manera selectiva con el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9 codifican una actividad antimicrobiana.

La invención se refiere de manera general a los polinucleótidos que codifican para los péptidos según la invención. Debido a la degeneración del código genético, diferentes polinucleótidos pueden codificar para un mismo polipéptido.

5

Casetes de expresión

Según un modo de realización de la invención, un polinucleótido que codifica para un péptido según la invención se inserta en un casete de expresión utilizando unas técnicas de clonación bien conocidas por el experto en la materia. Este casete de expresión comprende los elementos necesarios para la transcripción y para la traducción de las secuencias que codifican para los polipéptidos según la invención.

10

Ventajosamente, este casete de expresión comprende al mismo tiempo unos elementos que permiten hacer producir un péptido mediante una célula hospedante y unos elementos necesarios para la regulación de esta expresión.

15

Estos casetes de expresión comprenden, en el sentido de la transcripción:

- un promotor funcional en un organismo hospedante;
- un polinucleótido según la invención;
- una secuencia terminadora funcional en el mismo organismo hospedante.

20

Se puede utilizar cualquier tipo de secuencia promotora en los casetes de expresión según la invención. La elección del promotor dependerá en particular del organismo hospedante seleccionado para la expresión del gen de interés. Algunos promotores permiten una expresión constitutiva, mientras que otros promotores son, por el contrario, inducibles.

25

Entre los promotores funcionales en los hongos, se citará en particular el de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* (Roberts *et al.*, Current Genet. 15, 177-180, 1989).

30

Entre los promotores funcionales en las bacterias, se citará en particular el de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (Studier *et al.*, Methods in enzymology, 185, 60-89, 1990).

35

Entre los promotores funcionales en las levaduras, se citará el promotor del gen *GAL1* (Elledge *et al.*, Proc Natl Acad Sciences, USA. 88, 1731-1735, 1991) o los promotores *GAL4* y *ADH* de *S. cerevisiae*. Todos estos promotores están descritos en la bibliografía y son bien conocidos por el experto en la materia.

Para la expresión en *Penicillium funiculosum*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden un promotor histona H4B, un promotor ácido aspártico proteasa o un promotor *csi13* (WO 00/68401).

40

Para la expresión en la levadura *Pichia pastoris*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden el promotor *AOX1* inducible por el metanol (Tschopp *et al.*, Biotechnology, 5, 1305-1308, 1987) o el promotor constitutivo fuerte *GAP* (Waterham *et al.*, Gene 186, 37-44, 1997).

45

Para la expresión en *Schizosacchomyces pombe*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden el promotor de regulación *Nmt1* reprimido por la tiamina y activado en ausencia de tiamina (Maundrell, J. Biol. Chem. 265, 10857-10864, 1989).

Los casetes de expresión según la presente invención pueden además incluir cualquier otra secuencia necesaria para la expresión de los polipéptidos o de los polinucleótidos como, por ejemplo, unos elementos de regulación o unas secuencias señal que permiten la secreción de los polipéptidos producidos por el organismo hospedante. Se pueden utilizar en particular cualquier secuencia de regulación que permite aumentar el nivel de expresión de la secuencia codificante insertada en el casete de expresión. Según la invención, se pueden utilizar en particular, en asociación con la secuencia de regulación promotora, otras secuencias de regulación, que están situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como unos activadores de transcripción ("enhancer").

50

55

Además, los casetes de expresión según la presente invención pueden incluir cualquier otra secuencia necesaria para la secreción de los polipéptidos producidos por el organismo hospedante, tales como unas secuencias señal. Para la secreción por *Pichia pastoris*, se puede utilizar por ejemplo la secuencia del factor α como señal de secreción.

60

Una gran variedad de secuencias terminadoras son utilizables en los casetes de expresión según la invención, permitiendo estas secuencias la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Se puede utilizar cualquier secuencia terminadora funcional en el organismo hospedante seleccionado.

65

Para la expresión en *Penicillium funiculosum*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden un terminador histona H4.B, un terminador ácido aspártico proteasa o un terminador *csi13*

(WO 00/68401).

La presente invención tiene también por objeto un polinucleótido que comprende un casete de expresión según la invención, estando ventajosamente los casetes de expresión según la presente invención insertados en un vector.

Vectores

La presente invención se refiere asimismo a unos vectores de clonación o de expresión para la transformación de un organismo hospedante que comprende por lo menos un polinucleótido o un casete de expresión según la presente invención. Este vector puede corresponder en particular a un plásmido, un cósmido, un bacteriófago o un virus en el que se inserta un polinucleótido o un casete de expresión según la invención. Las técnicas de construcción de estos vectores y de inserción de un polinucleótido de la invención en estos vectores son conocidas por el experto en la materia. De manera general, se puede utilizar cualquier vector capaz de mantenerse, de autoreplicarse o de propagarse en una célula hospedante con el fin de inducir en particular la expresión de un polinucleótido o de un péptido. El experto en la materia seleccionará los vectores apropiados en función del organismo hospedante a transformar, y en función de la técnica de transformación utilizada.

Los vectores de la presente invención se utilizan en particular para transformar un organismo hospedante para la replicación del vector y/o la expresión de un péptido según la invención en el organismo hospedante.

La invención se refiere asimismo a un método para preparar un péptido según la invención que comprende las etapas siguientes:

- se transforma un organismo hospedante con un vector de expresión que comprende un casete de expresión según la invención y/o con un polinucleótido según la invención,
- se aíslan los péptidos producidos por el organismo hospedante.

Organismos hospedantes

La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de transformación de un organismo hospedante mediante la integración en dicho organismo hospedante de por lo menos un polinucleótido, de por lo menos un casete de expresión o de por lo menos un vector según la invención. El polinucleótido puede ser integrado en el genoma del organismo hospedante o replicarse de manera estable en dicho organismo hospedante. Los métodos de transformación de los organismos hospedantes son conocidos por el experto en la materia y están ampliamente descritos en la bibliografía.

La presente invención se refiere asimismo a un organismo hospedante transformado con un polinucleótido, un casete de expresión o un vector según la invención.

Por "organismo hospedante" se entiende en particular según la invención cualquier organismo mono o pluricelular, inferior o superior, en particular seleccionado de entre las bacterias, las levaduras y los hongos. En particular, por "organismo hospedante" se entiende un organismo no humano. De manera ventajosa, las levaduras se seleccionan de entre, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* y *Schwanniomyces occidentalis*. Los hongos se seleccionan por ejemplo de entre los *Aspergillus*, las *Trichoderma* y los *Penicilliums*, preferentemente de entre *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii* y *Trichoderma koningii*. En un modo de realización de la invención, el organismo hospedante es una cepa de *Penicillium funiculosum* en la que se expresa o sobreexpresa un péptido según la invención. En otro modo de realización, el organismo hospedante es una cepa de *Debaryomyces castellii* en la que se expresa o sobreexpresa un péptido según la invención. En otro modo más de realización, el organismo es una cepa de *Ruminococcus gnavus* en la que se expresa o sobreexpresa un péptido según la invención.

Las técnicas de construcción de vectores, de transformación de organismos hospedantes y de expresión de proteínas heterólogas en estos organismos están ampliamente descritas en la bibliografía, en particular por Sambrook, Fritsch y Maniatis, en la obra titulada "Molecular cloning: a laboratory manual", edición: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 o por Ausubel *et al.*, en la obra titulada "Current Protocols in Molecular Biology", edición: Greene Publishing Associates, Inc., and John Wiley and Sons, NY, 1992.

Cepas

La nueva cepa de *Ruminococcus gnavus* se depositó en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75015 París) el 19 de diciembre de 2006 bajo el número CNCM I-3705. La CNCM es una autoridad de depósito internacional según el artículo 7 del Tratado de Budapest.

La nueva cepa se obtuvo mediante mutagénesis aleatoria de la cepa *R. gnavus* L14. Esta cepa es un mutante

espontáneo de *R. gnavus* E1 que ha perdido la capacidad de producir RumA *in vitro*, pero que aún sintetiza RumC *in vivo*. Un agente alquilante potente, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG) se utilizó para la mutagénesis. No se obtuvo ninguna modificación genética mediante las técnicas de recombinación que utilizan un ADN o un ARN de otro origen.

5 El medio de cultivo de la cepa LEM 9-17 es preferentemente un medio BHI complementado con extracto de levadura y con hemina (BHI-YH).

Mezcla proteica, mosto de fermentación

10 La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de un péptido que presenta una actividad antimicrobiana según la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

15 a) cultivo de una cepa de *Ruminococcus gnavus* o de un organismo hospedante transformado según la invención en condiciones de inducción de la expresión del péptido, y

b) recuperación del sobrenadante de cultivo que comprende el péptido.

20 La separación del péptido a partir del sobrenadante de cultivo puede ser realizada por la carga, el tamaño y/o el carácter hidrófobo. El experto en la materia conoce las diferentes técnicas que permiten la separación en función de la carga, del tamaño y/o del carácter hidrófobo de los diferentes constituyentes de un medio.

25 Este sobrenadante de cultivo o mosto de fermentación puede después ser concentrado o liofilizado para la formulación de un aditivo alimenticio o de un alimento para animales. El procedimiento puede comprender unas etapas suplementarias de purificación de la sustancia antimicrobiana a partir del sobrenadante de cultivo.

Si el organismo hospedante no segrega la sustancia antimicrobiana en el medio de cultivo, puede ser necesaria una etapa suplementaria de ruptura de las células y de purificación del extracto celular.

30 Los péptidos de la invención pueden también ser obtenidos a partir del contenido cecal de rata monoxénica.

Composición

35 Las composiciones según la invención comprenden un péptido según la invención, un organismo hospedante según la invención, una cepa según la invención, un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención o un mosto de fermentación de una cepa según la invención. Las composiciones se presentan en forma líquida o en forma de polvo. Estas composiciones comprenden diferentes ingredientes.

40 Las composiciones líquidas pueden, por ejemplo, comprender otro agente antimicrobiano, por ejemplo ácido sórbico o una sal de ácido sórbico, ácido benzoico o una sal de ácido benzoico, ácido fumárico o una sal de ácido fumárico. Las composiciones de la invención pueden además comprender sorbitol. El sorbitol es un agente de estabilización y de formulación. Las composiciones de la invención pueden también comprender unos agentes anticongelantes, por ejemplo el etilenglicol, el glicerol, el propilenglicol y el propano-1,2-diol.

45 Las composiciones en forma de polvo comprenden un soporte. Este soporte se puede seleccionar de entre la harina de trigo, el almidón, la maltodextrina, el yeso y mazorcas de maíz.

50 Las composiciones según la invención presentan una actividad antimicrobiana. Proporcionan unas soluciones alternativas a la utilización de antibióticos. Pueden por ejemplo ser utilizadas en la crianza de los animales o como medicamento para el ser humano.

Las composiciones de la presente invención comprenden por lo menos un péptido según la invención, pero pueden también comprender otras sustancias como vitaminas, otros principios activos, aminoácidos o sales minerales.

55 Las composiciones según la invención permiten por ejemplo prevenir o tratar la enteritis necrótica en las aves de corral o en los cerdos, y prevenir o tratar las enfermedades gastrointestinales en el ser humano.

60 Las composiciones de la invención son, por ejemplo, añadidas a los alimentos para animales o son, por ejemplo, combinadas con una base nutricional. La presente invención se refiere por lo tanto también a los alimentos para animales que comprenden una composición según la invención. Estos alimentos se presentan habitualmente en forma de harinas o de granulados en los que se incorporan las composiciones que presentan una actividad antimicrobiana. La presente invención tiene asimismo por objeto unos alimentos para animales que comprenden un péptido según la invención, un organismo hospedante según la invención o un mosto de fermentación/sobrenadante de cultivo de un organismo hospedante según la invención.

65 Por "alimento" se entiende todo lo que puede servir para la alimentación de los animales. Por "base nutricional" se

5 entiende todo lo que constituye la parte esencial de la ración alimenticia del animal, constituida a título de ejemplo por una mezcla de cereales, de proteínas y de materias grasas de origen animal y/o vegetal. Habitualmente, estas bases nutricionales comprenden, por ejemplo, maíz, trigo, guisante y soja. Estas bases nutricionales están adaptadas a las necesidades de las diferentes especies animales a las que están destinadas. Puede tratarse por ejemplo de aves de corral (gallinas ponedoras, pollos de engorde, pavos y patos) o de cerdos (cerdos en crecimiento y desarrollados, lechones).

Utilización de los péptidos

10 La presente invención se refiere asimismo a la utilización de un péptido según la invención, de un organismo hospedante según la invención, de una cepa según la invención, de un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención o de un mosto de fermentación de una cepa según la invención para la fabricación de un medicamento.

15 La presente invención se refiere asimismo a la utilización de un péptido según la invención, de un organismo hospedante según la invención, de una cepa según la invención, de un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención o de un mosto de fermentación de una cepa según la invención como aditivo nutricional o, en asociación con otros compuestos, como alimento para animales.

20 Según un modo de realización de la presente invención, este medicamento o este aditivo nutricional está destinado a prevenir o tratar la enteritis necrótica en las aves de corral o en los cerdos.

Según un modo de realización de la presente invención, este medicamento o este aditivo nutricional está destinado a prevenir o tratar las enfermedades gastrointestinales en el ser humano.

25

Descripción de las figuras

30 Figura 1: cromatograma obtenido por tamizado molecular sobre Sephadex G-75 de la fracción soluble contenida en 10 g de contenidos cecales de ratas monoxénicas que alojan la cepa *R. gnavus* E1; en las abscisas, volumen de elución en ml; en las ordenadas, absorción a 280 nm; la zona rayada corresponde a las fracciones activas contra *C. perfringens* (fracciones 325 a 358).

35 Figura 2A: cromatograma obtenido por tamizado molecular de proteínas estándares sobre Sephadex G-75; en las abscisas, volumen de elución en ml; en las ordenadas, absorción a 280 nm; a: albúmina 67 kDa; b: ovalbúmina 43 kDa; c: quimotripsina: 25 kDa; d: ribonucleasa A 13,7 kDa.

Figura 2B: recta de calibración $\log(MM) = f(Ve)$ obtenida a partir de los cromatogramas de la figura 2A; en las abscisas, volumen de elución en ml; en las ordenadas, logaritmo de masa molecular.

40 Figura 3: cromatograma obtenido por HPLC sobre una columna intercambiadora de cationes de la fracción GF activa; en las ordenadas, en el lado izquierdo, absorción a 214 nm; en las ordenadas, en el lado derecho, concentración de NaCl en M; en las abscisas, tiempo en minutos.

45 Figura 4A: cromatograma obtenido por HPLC en fase inversa de la fracción CM activa; en las ordenadas, en el lado izquierdo, absorción a 214 nm; en las ordenadas, en el lado derecho, porcentaje de acetonitrilo eluyente; en las abscisas, tiempo en minutos.

50 Figura 4B y 4C: espectro de masas de las fracciones procedentes del HPLC en fase inversa; en las abscisas, masa/carga; en las ordenadas, intensidad de la señal.

Figura 5: esquema del protocolo de purificación de RumC a partir de contenidos cecales de ratas monoxénicas que alojan la cepa *R. gnavus* E1.

55 Figura 6: cromatograma obtenido por FPLC sobre una resina intercambiadora de cationes de la fracción SN 9-17 desalada; en las abscisas, tiempo en minutos; en las ordenadas, absorción a 214 nm

60 a: absorción a 214 nm
 b: concentración en NaCl
 c: conductividad
 d: caudal en ml/min.

Figura 7: espectros de masas de diferentes fracciones durante la purificación de la RumC; en las abscisas, masa/carga; en las ordenadas, intensidad de la señal.

65 Figura 7A: SN 9-17

Figura 7B: fracción CM activa

Figura 7C: R 10 kDa

5 Figura 8: espectro de masa de la fracción GF 47-50; en las abscisas, masa/carga; en las ordenadas, intensidad de la señal

Figura 9: esquema del protocolo de purificación de TumC a partir de la cepa mutante LEM 9-17.

10 Ejemplos

Material y métodos

1. Cepas bacterianas y medios de cultivo

15 La cepa *Ruminococcus gnavus* E1, productora de RumC, se aisló del microbiota fecal dominante de un adulto sano (Dabard *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 67, 4111-4118, 2001).

20 La cepa *R. gnavus* L14 es un mutante espontáneo de *R. gnavus* E1 que ha perdido la capacidad de producir RumA *in vitro* pero que aún sintetiza RumC *in vivo*.

La cepa *Ruminococcus gnavus* depositada a la CNCM el 19 de diciembre de 2006 bajo el número CNCM I-3705 procede de la mutagénesis aleatoria de la cepa L14; es capaz de producir RumC *in vitro*, sobre medio agar complementado con tripsina (500 µg/ml; pero no en medio líquido). Se trata de la cepa LEM 9-17.

25 La cepa utilizada como objetivo para los ensayos de actividad es la cepa *Clostridium perfringens* CpA (Dabard *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 67, 4111-4118, 2001).

30 Estas cuatro cepas son cultivadas en anaerobiosis, en una cámara de tipo "Freter" en atmósfera controlada ((85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂). Se incuban a 37°C en un medio BHI complementado con extracto de levadura y con hemina (BHI-YH).

BHI-YH líquido: 37 g/l de BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories)
5 g/l de extracto de levadura (Yeast Extract, Fluka)
5 mg/l de hemina (Hemin, Sigma)

Agar BHI-YH: idem + 15 g/L de agar (BACTO™ agar, Difco Laboratories)

2. Ensayo antimicrobiano a partir de una muestra líquida

35 Para efectuar un ensayo de actividad antimicrobiana a partir de una muestra líquida, se extienden 10⁴ a 10⁵ células de *C. perfringens* CpA sobre un medio agar. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se perforan unos pocillos de 6 mm de diámetro en el agar con la ayuda de una pipeta Pasteur. Las muestras de volumen inferior a 100 µl se depositan después en los pocillos y las cajas se incuban durante 16 a 24 h a 37°C. Si la muestra contiene una sustancia antimicrobiana dirigida contra *C. perfringens* CpA, el crecimiento de las bacterias se inhibe, lo que conlleva la formación de un "halo de inhibición" alrededor del pocillo. El ensayo de actividad puede también ser realizado depositando directamente 10 µl de la muestra a ensayar sobre el agar previamente inoculado con *C. perfringens*.

3. Ensayo de actividad antimicrobiana a partir de colonias que se desarrollan en medio agar

45 Después de 24 h de cultivo sobre medio agar complementado o no con 50 µg/ml de tripsina, la cepa potencialmente productora de una sustancia antimicrobiana se recubre de medio agar "blando" (que contiene 7,5 g de agar/l) que contiene la cepa diana. Este agar blando se prepara mezclando extemporáneamente 5 ml de medio agar en sobrefusión con 5 ml de medio líquido que contiene de 10⁴ a 10⁵ células de la cepa diana. Las cajas de Petri son entonces de nuevo incubadas durante 16 a 24 h a 37°C. Se observa un halo de inhibición alrededor de las colonias que producen una sustancia antimicrobiana.

4. Eliminación de los restos celulares y residuos de alimentación de los contenidos cecales

55 Se diluyen 10 g de contenido cecal en 30 ml de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4) y después se centrifugan a 10000g y a 4°C durante 15 minutos. El residuo que contiene los restos celulares y los residuos de la alimentación se elimina.

5. Unidades de filtración por centrifugación

60 Se trata de membranas filtrantes que permiten la separación de las proteínas en dos fracciones, en función de su

masa molecular después de la centrifugación. Estos sistemas pueden también ser utilizados para concentrar o desalar unas muestras.

5 Varios fabricantes proponen este tipo de producto. En la mayoría de los casos, las membranas están constituidas de celulosa regenerada, pero puede tratarse también de poliétersulfona. La elección del sistema se hace en función del volumen de las muestras a tratar y del umbral de corte de las membranas (tabla 1). Estas unidades de filtración se utilizaron según las instrucciones proporcionadas por el fabricante para la elección del tipo de rotor y la velocidad de centrifugación. Sin embargo, los tiempos de centrifugación son variables en función de la viscosidad de la muestra.

10 Tabla 1: características de las unidades de filtración utilizadas durante unos ensayos de purificación de RumC

Nombre	Tipo de membrana	Umbral de corte	Volumen máximo
AMICON® ULTRA-15 PL-5*	Celulosa regenerada	5 kDa	20 ml
MICROCON® YM-10*	Celulosa regenerada	10 kDa	0,5 ml
MICROCON® YM-3*	Celulosa regenerada	3 kDa	0,5 ml
VIVASPIN 500-5,000MWCO**	Poliétersulfona	5 kDa	0,6 ml
VIVASPIN 500-3,000MWCO**	Poliétersulfona	3 kDa	0,6 ml

producto de la marca Millipore; ** producto de la marca Sartorius

15 6. Tamizado molecular sobre SEPHADEX G-75

El tamizado molecular del sobrenadante de contenido cecal se realiza en una columna de Sephadex G-75 (2,4 x 187 cm). La muestra (cuyo volumen es de aproximadamente el 2% del volumen de la columna) se deposita sobre la columna, siendo la elución efectuada a 4°C a un caudal de 1 ml/min con la ayuda de PBS y se recogen 600 fracciones de 2 ml. Se obtiene un cromatograma mediante lectura de la absorción a 280 nm de cada fracción.

7. Tamizado molecular sobre FPLC

25 El tamizado molecular de la fracción CM activa se realiza sobre el sistema FPLC. La muestra se carga sobre una columna HiLoad 26/60 Superdex 30 pg (GE Healthcare). La elución se realiza a un caudal de 2,5 ml/min. con PBS. El material proteico eluido se detecta mediante la medición de la variación de absorción a 280 nm. Las fracciones que corresponden a 2 min de elución se recogen automáticamente.

30 8. HPLC sobre columna de CM intercambiadora de cationes

35 La HPLC intercambiadora de cationes se realiza sobre una cadena WATERS 600S CONTROLLER provista del inyector WATERS 616 PUMP. La muestra (0,5 ml) se carga sobre una columna semipreparativa CM-3SW SPHEROGEL de TSK. La elución se realiza a pH 5 en un tampón de acetato de sodio 20 mM y a un caudal de 0,8 ml/min., utilizando un gradiente de concentración en NaCl de 0 a 1 M. Durante los 20 primeros minutos, la elución se efectúa en modo isocrático sin NaCl y después mediante un gradiente lineal de concentración en NaCl de 0 a 0,5 M durante 30 minutos. La elución se continúa entonces durante 5 minutos en condiciones isocráticas, y después se realiza un salto hasta una concentración de 1 M en NaCl en 1 minuto, antes de continuar durante 15 minutos en condiciones isocráticas y, por último, volver a las condiciones iniciales. El material proteico eluido se detecta mediante la medición de la absorción a 280 o 214 nm con la ayuda del WATERS 486 TUNABLE ABSORBANCE DETECTOR. Las fracciones son recogen automáticamente y después se desalan con la ayuda de los sistemas AMICON® ULTRA PL-5.

45 9. FPLC sobre columna intercambiadora de cationes

50 Las cromatografías intercambiadoras de cationes se realizan sobre una cadena FPLC. La muestra se carga sobre una columna Hi-Prep 16/10 CM FF (GE Healthcare). La elución se realiza a pH 5 en un tampón de acetato de sodio 20 mM, utilizando un gradiente de concentración en NaCl de 0 a 0,4 M. Durante 50 minutos, la elución se efectúa en modo isocrático sin NaCl, a un caudal de 2 ml/min. La elución se continúa después a un caudal de 5 ml/min. mediante un gradiente lineal de concentración en NaCl de 0 a 0,4 M en 40 minutos. El material proteico eluido se detecta mediante la medición de la variación de absorción a 280 nm. Se recogen automáticamente unas fracciones de 1 min. y después se desalan sobre Sep-pak®C18 Cartridges.

10. HPLC en fase inversa

55 La HPLC en fase inversa se realiza en un equipo Alliance Waters 1690 Separations Module. La muestra (100 µl) previamente acidificada con 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) se carga sobre una columna analítica Vydac 218TP52 250x2. La elución se realiza a caudal constante (0,5 ml/min.). Después de 10 minutos de elución en modo isocrático con el 15% de acetonitrilo, se aplica un gradiente lineal del 15% al 30 % de acetonitrilo en 60 minutos. Después, se realiza un salto al 70% de acetonitrilo en 1 minuto y la elución se continúa durante 19 minutos en

condiciones isocráticas, antes de volver a las condiciones iniciales. El material proteico eluido se detecta mediante la medición de la variación de absorción a 214 nm con la ayuda del Waters 996 Photodiode Array Detector. Se recogen automáticamente unas fracciones de 0,5 ml. El acetonitrilo se evapora con la ayuda de un Speed Vac Concentrator (Savant).

5 11. Espectrometría de masas

Los análisis de espectrometría de masas se realizaron en un platillo proteómico Timone (Facultad de farmacia, Marseille, Francia).

10 Los espectros de masas de tipo Maldi se obtuvieron sobre un espectrómetro ETTAN MALDI-TOF PRO (GE Healthcare,-Uppsala, SUEDE) utilizado en modo lineal positivo con extracción retardada. Las muestras son cocrystalizadas con una solución de 5 mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico sobre el objetivo Maldi mediante el método de la gota seca. Los espectros son adquiridos con un potencial de aceleración de 20 KV y una potencia láser regulada al nivel mínimo, lo que permite obtener una buena señal. La calibración de los espectros se obtiene en modo externo por adquisición de una mezcla de péptidos estándar de masas conocidas (Pepmix4, Laserbiolabs, Nice, Francia).

15 Para algunas muestras difíciles de cristalizar, la cocrystalización se realiza con la ayuda de una solución de ácido 2,5-dihidroxi-benzoico.

20 12. Secuenciación de Edman

25 Esta técnica se basa en la reacción de un grupo amina terminal libre de una proteína con el isotiocianato de fenilo ($C_6H_5N=C=S$). Este compuesto cíclico efectúa un ataque nucleófilo en medio básico sobre el primer residuo de aminoácido de la proteína. El derivado feniltiocarbamilo (PCT) del péptido se escinde después por hidrólisis. Se obtiene la anilino-tiazolinona (ATZ) del primer aminoácido y la proteína que ha perdido este aminoácido. El aminoácido-ATZ se convierte después en feniltiohidantoína (PTH) aminoácido.

30 Los PTH-aminoácidos obtenidos sucesivamente son separados e identificados por RP-HPLC midiendo la absorción a 280 nm y comparando los tiempos de elución.

El ciclo de reacción puede ser repetido y conduce así a la secuencia de la proteína.

35 13. Mutagénesis aleatoria

Se reparte un cultivo de 14 ml de la cepa L14 incubada durante 24h a 37°C en 7 tubos de 2 ml, después los tubos son centrifugados a 5800 g durante 10 minutos. Los residuos celulares se lavan, dos veces, con 2 ml de tampón citrato 0,1 M (ácido cítrico 21 mg/ml, NaOH 8,8mg/ml, pH 5,5) y después se recogen en un tampón citrato que contiene unas concentraciones crecientes en N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG), agente mutágeno potente.

Tabla 2: volúmenes de las soluciones utilizadas durante los desalados sobre SEP-PAK

Tubos	1 (T-)	2	3	4	5	6	7
[NG] final en μ g/ml	0	25	50	100	200	400	1000

45 Los tubos son después incubados durante 30 minutos a 37°C antes de ser centrifugados durante 10 minutos a 5800 g. El residuo se lava con un tampón fosfato 0,1 M (KH_2PO_4 13,6 mg/ml, NaOH 2,32 mg/ml, pH 7) y después se recoge en un medio BHI-YH líquido.

50 14. Desalado sobre SEP-PAK®C18 Cartridges (Waters)

Según los modelos, estas columnas se presentan en forma de jeringas en las que la fase se vierte, o de minicolumnas fijadas en el extremo de una jeringa. El caudal de los tampones está asegurado por una bomba peristáltica. En una primera etapa, la columna se equilibra por el paso de H_2O y después de CH_3CN y por último de H_2O que contiene el 0,05% de TFA. Se deposita después la muestra previamente acidificada con el 0,05% de TFA. La elución se realiza en 3 etapas, mediante adiciones sucesivas de H_2O - TFA 0,05%, de CH_3CN 40% - TFA 0,05% y de CH_3CN - TFA 0,05%.

55 Se recogen por tanto tres fracciones: la fracción que corresponde a las proteínas no retenidas por la columna y a las sales (fracción NR), la fracción que contiene las proteínas eluidas con el 40% de CH_2CN (fracción 40% ACN) y la fracción que contiene las proteínas eluidas con el 100% de CH_3CN (fracción 100% ACN). El disolvente se evapora con la ayuda de un Speed Vac Concentrator o de un Rotavapor según el volumen.

60 La tabla 3 indica los volúmenes de cada solución utilizada para el desalado de fracciones procedentes de la purificación de RumC (véanse los resultados y los comentarios). Estos volúmenes dependen del volumen de fase de

SEP-PAK.

Tabla 3: volúmenes de las soluciones utilizadas durante SEP-PAK en función de las aplicaciones

		Desalado de:	
		SN 9-17	Fracción CM activa
Volumen de:			
Fase		12 ml	1 ml
Equilibrado	H ₂ O	20 ml	5 ml
	CH ₃ CN	20 ml	5 ml
	H ₂ O - TFA 0,05%	30 ml	5 ml
	Muestra	30-35 ml	50 ml
Elución	H ₂ O - TFA 0,05%	30-35 ml	15 ml
	CH ₃ CN 40% - TFA 0,05%	20 ml	6 ml
	CH ₃ CN - TFA 0,05%	20 ml	4 ml

5

15. Ensayo de resistencia a la temperatura

Se calientan unas partes alícuotas de una fracción que contiene RumC, cada una a una temperatura diferente, con la ayuda de un bloque calentador durante 5 o 15 minutos, y después se conservan a 4°C. Después, se someten a un ensayo de actividad antimicrobiana.

10

16. Ensayo de resistencia al pH

Unas partes alícuotas de una fracción que contiene RumC son diluidas aproximadamente 10 veces en el tampón deseado. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, cada solución se deposita sobre una unidad de filtración Vivaspín 500 3 kDa y después se centrifugan según las instrucciones del fabricante. Se añade un tampón a la fracción retenida por el Vivaspín 500 y después la unidad de filtración de centrifuga de nuevo. El volumen de cada una de las fracciones retenidas por el Vivaspín 500 3 kDa, es decir que contiene RumC, se ajusta con la ayuda del tampón para corresponder al volumen de partida. Las diferentes fracciones se conservan después a 4°C antes de ser sometidas a un ensayo de actividad antimicrobiana.

15

20

Los filtros de Vivaspín 500 3 kDa no soportan unos pH superiores a 9. Por lo tanto, sólo se ensayan unos tampones de pH ácido o neutro. Su composición es la siguiente:

25

Tampón pH 2: KCl 50 mM - HCl 13 mM
 Tampón pH 4,4: tampón acetato de sodio 0,2 M pH 4,4
 Tampón pH 7: KH₂PO₄ 50 mM - NaOH 39 mM

Resultados y comentarios

30

1. Purificación de RumC a partir de contenidos cecales

Aunque la cepa *Ruminococcus gnavus* E1 es cultivable, RumC no se produce *in vitro* en las condiciones de cultivo ensayadas. Para purificar RumC, se necesita por lo tanto trabajar a partir de contenidos cecales de ratas monoxénicas que alojan la cepa E1, o crear una cepa mutante de *R. gnavus* capaz de producir RumC *in vitro* (véase la parte 2).

35

1.1 Dilución del contenido cecal de rata monoxénica

La primera etapa consistió en diluir el contenido cecal en PBS.

40

1.2. Eliminación de los restos celulares

Durante la segunda etapa de purificación, las bacterias, los restos celulares y los residuos alimenticios son eliminados por centrifugación del contenido cecal.

45

1.3. Concentración

La solución se concentra después sobre un sistema AMICON® ULTRA-15 PL-5 antes de ser depositada sobre una columna de tamizado molecular.

50

1.4. Ensayo de actividad antimicrobiana

Todas las fracciones obtenidas se ensayaron sobre la cepa *C. perfringens* CpA, lo que confirmó la presencia de una sustancia anti-*C. perfringens* en los contenidos cecales de ratas monoxénicas.

55

Se realizó un control negativo con unos contenidos cecales de ratas axénicas (sin gérmenes). No se ha detectado ninguna actividad anti-*C. perfringens*. La sustancia anti-*C. perfringens* presente en los contenidos cecales de ratas monoxénicas es por lo tanto bien específica de *R. agnus* E1.

A continuación, se siguió cada ensayo de purificación mediante unos ensayos de actividad anti-*C. perfringens*. En una primera etapa, sólo se investigó la presencia o la ausencia de la actividad, asegurando que los resultados negativos no estaban sólo relacionados con el umbral de sensibilidad de la técnica. Se realizaron unos ensayos cuantitativos en una segunda etapa, cuando se estableció el protocolo definido.

1.5. Tamizado molecular sobre una columna de SEPHADEX G-75

Se ha realizado un tamizado molecular sobre una columna de SEPHADEX G-75 (2,4 x 187 cm). La elución se siguió por lectura de la absorción a 280 nm de cada una de las 600 fracciones de 2 ml recogidas.

Se realizaron unos ensayos de actividad antimicrobiana sobre las fracciones previamente concentradas con la ayuda de MICROCON[®] YM-3.

Las fracciones 325 a 358 se mostraron activas contra *C. perfringens* y se agruparon para formar la nueva fracción GF activa (zona rayada de la figura 1).

Un control realizado con unos contenidos cecales de ratas axénicas condujo a un perfil de elución comparable al obtenido con los contenidos cecales de ratas monoxénicas, pero no se ha podido detectar ninguna actividad anti-*C. perfringens*.

1.6. Evaluación del tamaño de RumC

Con el fin de evaluar el tamaño de RumC presente en la fracción GF activa, se han depositado unas proteínas estándar de masas moleculares conocidas sobre la misma columna de Sephadex G-75 y se han medido los volúmenes de elución respectivos (figura 2A). Se trazó entonces una recta de calibración que define la proporcionalidad entre el logaritmo de la masa molecular (log (MM)) de una sustancia y su volumen de elución (V_e) (figura 2B). Con un volumen de elución medio de 683 ml, la sustancia antimicrobiana no está comprendida en el rango de las proteínas estándares seleccionadas, pero por extrapolación, su masa molecular ha podido ser evaluada aproximadamente a 5200 Da.

1.7. Cromatografía sobre resina intercambiadora de cationes

A partir de la fracción GF activa, se ha considerado una cromatografía intercambiadora de cationes sobre columna de carboximetilo (CM) - SPHEROGEL[™], con la ayuda de un sistema HPLC. La elución se realizó mediante un gradiente de concentración en NaCl, a pH 5 y se siguió a 214 nm (figura 3).

La actividad se encuentra entre los minutos 32 y 38 (fracción CM activa), lo que corresponde a una concentración en NaCl de 0,2 a 0,3 M. Esta técnica ha permitido eliminar unos contaminantes en la fracción no retenida, en particular todos los pigmentos amarillos.

El análisis por espectrometría de masa de la fracción CM activa muestra que contiene un péptido único de aproximadamente 4200 Da (resultado no mostrado).

Esta fracción se sometió a una secuenciación N-terminal. Los once primeros aminoácidos pudieron así ser determinados: AGVIX(N/S)GTXAV (SEC ID nº 10). Esta secuencia no presenta ninguna homología fuerte con las proteínas conocidas.

La secuenciación ha demostrado asimismo dos secuencias minoritarias.

1.8. Cromatografía en fase inversa por HPLC

Se han obtenido diferentes picos de absorción a 214 nm.

La actividad se demostró en las 2 fracciones designadas por a (o "doble pico") y b (o "pico aislado") (Figura 4A). El análisis por espectrometría de masa de estas 2 fracciones reveló la presencia de 3 péptidos mayoritarios cuya masas moleculares respectivas están comprendidas entre 4230 y 4460 Da (Figura 4B y 4C).

La purificación de RumC a partir de contenidos cecales se realizó de nuevo utilizando las 3 cromatografías desarrolladas, es decir tamizado molecular, intercambiador de cations y fase inversa. Los perfiles de elución obtenidos son comparables a los de los primeros ensayos desarrollados. El método de purificación de RumC es por lo tanto reproducible y puede ser así adoptado.

El esquema recapitulativo de la purificación de RumC a partir de contenidos cecales está representado en la figura 5.

5 1.9. Rendimientos y factores de purificación

Por convención, el número de unidades arbitrarias de actividad (UAA) presentes en una solución se define como la inversa de la última dilución activa. Por lo tanto, se ha realizado un ensayo de actividad anti-*C. perfringens* sobre unas diluciones en cascada (de 2 en 2) de cada fracción activa procedente de la purificación.

10 El factor de purificación se obtiene comparando las actividades específicas, expresadas en UAA/mg de proteínas, de cada fracción. Se ha deducido una estimación de la cantidad de proteínas en las diferentes fracciones a partir de la medición de su absorción a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción másica $E^{0,1\%}$ de 1,8.

15 La tabla 4 da los rendimientos en actividad y los factores de purificación de las etapas del protocolo de purificación de RumC a partir de los contenidos cecales de ratas monoxénicas.

Tabla 4: Rendimientos en actividad y factores de purificación durante la preparación de RumC "in vivo" a partir de 10 g de contenidos cecales de ratas monoxénicas

20

Fracción	V (ml)	A. anti-CpA (UAA)	m _{proteínas} (mg)	AS (UAA/mg)	Rdt.	F. purif.
Homogeneizado	39	780	nd		100 %	
SN	32	375	375	1	48%	1
SN concentrado	14	350	270	1,3	45%	1,3
GF activa	66	205	20	10,3	26%	10
CM activa	1-1,5	170	0,135	1260	22%	1200
Doble pico	1-1,5	50	nd		13%	
Pico aislado	1-1,5	50	nd			

nd = no determinado

V: volumen total de la fracción en ml

anti-CpA: actividad anti-*C. perfringens*, es decir número total de unidades de actividad contenidas en la fracción.

25 m_{proteínas}: masa de proteínas en la fracción expresada en mg

AS: actividad anti-*C. perfringens* específica en UAA/mg

AS = A. anti-CpA/m_{proteínas}

Rdt.: rendimiento en actividad de la purificación

30 Rdt. = 100 x A. anti-CpA_{fracción estudiada} / A. anti-CpA_{homogeneizado}

F. purif.: factor de purificación

F. purif. = AS_{fracción estudiada} / AS_{SN}

1.10 Determinación de la secuencia peptídica

35 Aunque las masas moleculares de los productos presentes en las fracciones "doble pico" y "pico aislado" sean diferentes, la secuenciación según Edman ha permitido establecer una sola secuencia N-terminal mayoritaria: AGXIXSGSVAV (SEC ID nº 3).

40 En las 2 fracciones en cuestión, también se ha puesto en evidencia una secuencia minoritaria de 17 residuos: AGPAYXVGYXGNNGAVT (SEC ID nº 2).

2. Creación de una cepa mutante por mutagénesis aleatoria

45 La técnica elegida fue una mutagénesis aleatoria de la cepa *R. gnavus* L14. Esta cepa es un mutante espontáneo de *R. gnavus* E1 que ha perdido la capacidad de producir RumA *in vitro* pero que aún sintetiza RumC *in vivo*. Esta cepa se ha expuesto a un agente alquilante potente, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG).

50 Las partes alícuotas de un mismo cultivo de la cepa L14 se expusieron así a concentraciones en NG crecientes (0 a 1000 µg/ml). Después del tratamiento, se diluyeron las diferentes suspensiones celulares y después se extendieron sobre cajas de Petri. El recuento de las colonias después del cultivo ha permitido estimar la concentración de las células vivas en las diferentes suspensiones.

55 Por comparación con la concentración del control (tubo 1, sin tratamiento NG), se ha podido determinar un índice de mortalidad para cada tratamiento. Parece que el tratamiento con NG ha sido eficaz: los índices de mortalidad están comprendidos entre el 50% y el 99% y aumentan con la concentración.

Con el fin de buscar el o los mutantes de interés, cerca de 860 colonias seleccionadas al azar de entre los clones

que han sobrevivido a los diferentes tratamientos, se sub-cultivaron sobre medio agar complementado con tripsina y después sometidos a un ensayo de actividad anti-*C. perfringens*.

5 Ochenta y tres clones se mostraron potencialmente productores de una sustancia anti-*C. perfringens* sobre un medio agar en presencia de tripsina.

Entre ellos, 20 se seleccionaron para una caracterización más avanzada.

10 En una primera fase, se verificó que las mutaciones que afectan los clones no habían restaurado la organización cromosómica a nivel de *rumA*, a través de una PCR.

Los 20 clones seleccionados han sufrido después unos ensayos de actividad anti-*Clostridium perfringens* sobre medio agar y en medio líquido, en presencia o en ausencia de tripsina.

15 Sobre el medio agar complementado con tripsina, está presente un halo de inhibición en aproximadamente de 7 de los 20 clones ensayados.

20 Por el contrario, sobre el medio agar sin tripsina, ningún clon produce una sustancia anti-*C. perfringens*: la tripsina es por lo tanto siempre indispensable para la síntesis de la bacteriocina.

No se produce ninguna sustancia anti-*C. perfringens* por los clones cultivados en medio líquido, incluso en presencia de tripsina.

25 3. Purificación a partir de la cepa mutante

Se realizaron unos ensayos de producción y de purificación sobre uno de los 7 clones productores: el mutante 9-17.

30 Los ensayos se realizaron sobre agar blando con unas concentraciones variables en células y en tripsina. Después del cultivo del mutante, el agar se trituró y después se centrifugó para recuperar un sobrenadante (SN 9-17). Este sobrenadante se ensaya entonces contra *C. perfringens* y se mostró como activo. Sobre este sobrenadante activo se realizó un análisis por espectrometría de masas (figura 7A).

35 3.1 Cromatografía sobre resina intercambiadora de cationes con la ayuda del sistema FPLC

Antes de realizar la cromatografía intercambiadora de iones, se necesita desalar la muestra.

Los primeros ensayos han mostrado que un desalado del SN 9-17 sobre AMICON no era suficiente. Un desalado de la muestra sobre SEP-PAK se debe por lo tanto considerar como etapa preliminar de purificación.

40 La elución de las proteínas de SEP-PAK se realiza con una solución de acetonitrilo al 40%. Después de la evaporación del acetonitrilo en un rotavapor, la solución se equilibra a pH 5 diluyéndola en un tampón de acetato de sodio 20 mM - pH 5. A partir de 65 ml de SN 9-17, se obtienen 50 ml de SN 9-17 desalado equilibrado a pH 5 que se cargan sobre una columna de carboximetil-sefarosa, intercambiadora de cationes.

45 El gradiente de concentración de 0 a 0,4 M en NaCl se efectuó en 40 minutos. La actividad anti-*C. perfringens* se detecta en las fracciones eluidas con 0,2 a 0,3 M en NaCl, aunque en estas fracciones esté presente muy poco material proteico, si se hace referencia a la variación de absorción a 280 nm (figura 6). Esto ya se había observado durante la purificación de RumC a partir de contenidos cecales. Las fracciones activas se agruparon y después se desalaron y se concentraron sobre SEP-PAK. El análisis por espectrometría de masas de esta fracción ("fracción CM activa") confirma la ganancia de purificación importante aportada por la cromatografía intercambiadora de cationes y muestra que los contaminantes tienen todos una masa molecular inferior a 2500 Da (figura 7B).

50 3.2. Tamizado molecular de la fracción CM

55 El tamizado molecular de la fracción CM activa se realizó gracias al sistema FPLC sobre una columna que permite la separación de péptidos de masa inferior a 10 kDa. La elución se continúa mediante lectura de la variación de absorción a 280 nm, la cantidad de material proteico es baja y la separación se muestra poco satisfactoria (no mostrado). La actividad anti-*C. perfringens* se ensayó de todas formas en las fracciones recogidas. Sólo el 5% de la actividad cargada se vuelve a encontrar después del tamizado. Por lo tanto, esta técnica no se eligió para la purificación. Sin embargo, la fracción activa ("GF 47-50") se analizó por espectrometría de masas y se reveló casi pura con un péptido de 4235 Da (figura 8).

60 3.3. Filtración de la fracción CM

65 Se experimentó otro intento para eliminar los contaminantes de la fracción CM activa, con la ayuda de unidades de filtración. Como RumC está retenida por los filtros de 5 kDa (a pesar de tener una masa molecular ligeramente

inferior), se realizó un primer ensayo con una unidad de filtración VIVASPIN 500 cuyo umbral de corte es de 5 kDa. Desafortunadamente, las impurezas son también retenidas por el filtro, a pesar de que sus masas moleculares sean inferiores a 2,5 kDa. En efecto, el análisis por espectrometría de masas no revela ninguna ganancia de purificación (resultados no mostrados). Se intentó por lo tanto un segundo ensayo con una unidad de filtración MICROCON cuyo umbral de corte es de 10 kDa. En efecto, a pesar de su masa molecular, se observó anteriormente que RumC podría ser retenida por unos filtros de 10 kDa ("fracción R 10 kDa"). El análisis por espectrometría de masas confirma los resultados anteriores y permite mostrar que una gran parte de los contaminantes se elimina en la fracción no retenida (figura 7C).

3.4. Cromatografía en fase inversa sobre sistema HPLC de la fracción R 10 kDa.

La fracción R 10 kDa que contiene los 3 picos RumC (4235 Da, 4324 Da y 4456 Da) se sometió después a una HPLC en fase inversa. Las condiciones de caudal y de gradiente son idénticas a las utilizadas para la purificación de RumC a partir de contenidos cecales, el resultado obtenido es comparable: 2 fracciones diferentes son activas contra *C. perfringens*, una fracción "doble pico" y una fracción "pico aislado".

3.5. Rendimientos y factores de purificación

Para evaluar el protocolo de purificación, se realizaron unos ensayos de actividad cuantitativos utilizando unas diluciones en cascada de 2 en 2 de cada fracción activa. El número de unidades arbitrarias de actividad (UAA) contenidas en cada fracción se calculó después y se dedujo el rendimiento de la purificación (tabla 5). Se observa una pérdida importante de la sustancia activa durante unas etapas de desalado del sobrenadante de cultivo, de la cromatografía intercambiadora de cationes seguida de otro desalado. Es probable que la pérdida tenga lugar durante la cromatografía intercambiadora de cationes, pero esto no pone en duda la validez del protocolo.

Tabla 5: Rendimientos de la purificación de RumC a partir de sobrenadante de cultivo del mutante 9-17.

Fracción	V (ml)	A. anti-CpA (UAA)	Rendimiento
SN 9-17	125	1453	100%
CM activa	≈3	300	21%
Doble pico	0,42	140	}19%
Pico aislado	0,42	140	

V: volumen total de la fracción en ml.

anti-CpA (actividad anti-*C. perfringens*); número total de unidades de actividad contenidas en la fracción en UAA.

Rendimiento = $100 \times A. \text{ anti-CpA}_{\text{fracción estudiada}} / A. \text{ anti-CpA}_{\text{SN9-17}}$; expresado en %.

Otro criterio importante para evaluar un protocolo de purificación es la demostración de la ganancia aportada por cada etapa. El factor de purificación se determina comparando las actividades específicas (UAA / mg de proteínas) en cada etapa, pero para eso se necesita medir la masa de proteínas contenida en cada fracción. El seguimiento de la purificación se realizó por espectrometría de masas debido a la sensibilidad de este método, que permite no "consumir" demasiado material biológico. A pesar de que este método no sea cuantitativo, la ganancia de purificación se demostró de manera muy clara.

3.6. Espectrometría de masas

Las fracciones "doble pico" y "pico aislado" se analizaron por espectrometría de masas. Los resultados obtenidos son idénticos a los obtenidos con las fracciones procedentes de la purificación a partir de contenidos cecales: la fracción "doble pico" contiene los péptidos de 4324 Da y 4456 Da, mientras que la fracción "pico aislado" contiene el péptido de 4235 Da.

3.7. Secuenciación

Por lo tanto, se secuenciaron estas fracciones

Para la fracción "pico aislado", la secuencia obtenida es idéntica a la secuencia ya determinada: AGXIXSGSVAV (SEC ID nº 3). Una secuencia minoritaria aparece al 5º ciclo: AGPAY (SEC ID nº 11).

En lo referente a la fracción "doble pico", se observan ligeras diferencias: AGXVXSGSTAV (SEC ID nº 12). La secuencia minoritaria es idéntica: AGPAY (SEC ID nº 11).

El esquema recapitulativo para la purificación de RumC a partir de la cepa mutante se representa en la figura 9.

La obtención de RumC purificado es ampliamente simplificada.

4. Caracterización de los péptidos RumC

4.1. Actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas

5 La actividad antimicrobiana de RumC se ensayó contra diferentes cepas patógenas de Gram+ y de Gram-, utilizando en una primera etapa el sobrenadante concentrado de contenido cecal de rata monoxénica para la cepa *R. gnavus* E1 (SN CCE1). Se realizaron después otros ensayos con las 2 fracciones purificadas contra las cepas sensibles al SN CCE1. Los resultados son presentados en la tabla 6.

10 Tabla 6: Resultados de los ensayos de actividad de RumC contra diferentes cepas patógenas

Cepa ensayada / Fracción		Actividad antimicrobiana (tamaño del halo de inhibición)		
		SN CCE1	Doble pico	Pico aislado
Gram+	<i>Clostridium perfringens</i> CpA	+ (2mm)	+ (1mm)	+ (1mm)
	<i>Clostridium perfringens</i> S40	+ (2mm)	+ (1mm)	+ (1mm)
	<i>Clostridium sporogenes</i> CIP 79-3	-	Nd	nd
	<i>Clostridium acetobutylicum</i> BL75-41	-	Nd	nd
	<i>Bacillus cereus</i> TZ415	+ (2mm)	+ (5mm)	+ (3mm)
	<i>Bacillus cereus</i> K1231	-	Nd	nd
	<i>Bacillus cereus</i> Z421	-	Nd	nd
	<i>Listeria monocytogenes</i> EGDE	+ (1mm)	+ (1mm)	+ (1mm)
	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	-	Nd	nd
	<i>Listeria innocua</i> CIP 80-12	+ (1mm)	-	-
Gram-	<i>Salmonella enteritidis</i> CIP 82-17	+ (5mm)	-	-
	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	nd	nd

Todas las cepas *Clostridium perfringens* ensayadas son sensibles al péptido RumC.

15 4.2. Poder antimicrobiano contra *C. perfringens*

El poder antimicrobiano de RumC se evaluó asimismo estimando la concentración mínima inhibidora de cada fracción purificada RumC "in vivo" y comparándola con la del metronidazol, antibiótico de referencia utilizado contra *C. perfringens*.

20 Para ello, se han preparado unas diluciones en cascada de 2 en 2 de las fracciones "doble pico" y "pico aislado" (hasta la dilución 1/512). Se realizaron unos ensayos de actividad anti-*C. perfringens* a partir de estas diferentes diluciones así como de soluciones de metronidazol a diferentes concentraciones (resultados no mostrados).

25 Según este ensayo, la concentración mínima inhibidora del metronidazol es de 25 µg/ml. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos anteriormente por Dabard *et al.* (Dabard *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 67, 4111-4118, 2001).

30 En lo que se refiere a las fracciones "doble pico" y "pico aislado", sólo las soluciones concentradas (dilución 1) son activas. Aunque la concentración de estas soluciones no sea conocida con precisión, esta se puede estimar, gracias a la secuenciación de Edman, a aproximadamente 40 µg/ml.

El poder antimicrobiano de RumC contra *C. perfringens* parece por lo tanto comparable con el del metronidazol.

35 4.3. Resistencia a la temperatura

Los primeros ensayos preliminares de resistencia de RumC al calor se realizaron incubando una misma cantidad de péptido durante 15 minutos a diferentes temperaturas. Para las 2 fracciones de RumC "in vivo" ("doble pico" y "pico aislado"), un tratamiento de 15 minutos a 75°C no tiene ningún efecto sobre la actividad. Por el contrario, a 100°C el péptido está totalmente inactivado en 15 minutos.

40 Estos ensayos se completaron con la ayuda de muestras de RumC purificadas a partir de sobrenadantes de cultivo de la cepa 9-17. El tiempo de incubación a las diferentes temperaturas fue de 5 minutos. El tiempo de incubación a 100°C fue de 15 minutos.

45 La primera temperatura ensayada fue a 80°C. El primer ensayo se efectuó con la fracción CM activa, fracción pre-purificada que contiene los 3 péptidos.

50 Al contrario que las fracciones "doble pico" y "pico aislado", la fracción CM activa resiste a un tratamiento de 15 minutos a 100°C.

Se ensayó después la fracción GF47-50. Esta fracción pura que contiene únicamente el péptido de 4235 Da es sensible al tratamiento de 15 minutos a 100°C. Además, es sensible a un tratamiento de 5 minutos a 90°C (Tabla 7)

5 Tabla 7: tabla recapitulativa de los ensayos de resistencia a la temperatura.

Condiciones de incubación		RumC "in vivo"		RumC "in vitro"	
Temperatura	Tiempo	Doble pico	Pico aislado	Fracción CM activa	GF 47-50
50°C	15 min	R	R	/	/
75°C	15 min	R	R	/	/
80°C	5 min	/	/	R	/
85°C	5 min	/	/	R	/
90°C	5 min	/	/	R	s
95°C	5 min	/	/	R	/
100°C	15 min	s	s	R	s

R = resistente; s = sensible; / = no ensayado

10 4.4. Resistencia al pH

La resistencia al pH de los péptidos presentes en la fracción CM activa se ensayó también a pH 2, pH 4,4 y pH 7.

15 La actividad observada a pH 2 es comparable a la observada a pH 7. Después de una incubación de 24h a 4°C, no se ha observado ninguna pérdida de actividad a pH 2.

Los péptidos de la presente invención son por lo tanto resistentes al pH ácido y son convenientes en particular para la nutrición animal o en el campo de los medicamentos.

20 **Listado de secuencias**

<110> ADISSEO FRANCE SAS

<120> Péptido RumC que presentan una actividad antimicrobiana

25 <130> xx-53845

<160> 12

30 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

35 <213> *Ruminococcus gnavus*

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

40 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

45 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

50 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

55 <223> xaa can be any naturally occurring amino acid

ES 2 461 548 T3

<400> 1

Ala Gly Pro Ala Tyr Xaa Val Gly Tyr Xaa Gly Asn Xaa Gly Xaa Val
1 5 10 15

Thr

5 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> *Ruminococcus gnavus*

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

20 <400> 2

Ala Gly Pro Ala Tyr Xaa Val Gly Tyr Xaa Gly Asn Asn Gly Ala Val
1 5 10 15

Thr

25 <210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> *Ruminococcus gnavus*

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> xaa can be any naturally occurring amino acid

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

40 <400> 3

Ala Gly Xaa Ile Xaa Ser Gly Ser Val Ala Val
1 5 10

45 <210> 4
<211> 63
<212> PRT
<213> *Ruminococcus gnavus*

50 <400> 4

ES 2 461 548 T3

Met Arg Lys Ile Val Ala Gly Lys Leu Gln Thr Gly Ala Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly Ser Lys Trp Gly Cys Val Cys Ser Gly Ser Thr Ala Val Ala Asn
20 25 30

Ser His Asn Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Asn
35 40 45

Gly Val Val Thr Arg Asn Ala Asn Ala Asn Val Ala Lys Thr Ala
50 55 60

<210> 5

<211> 63

<212> PRT

<213> *Ruminococcus gnavus*

<400> 5

Met Arg Lys Ile Val Ala Gly Lys Leu Gln Thr Gly Ala Asp Phe Glu
1 5 10 15

Gly Ser Lys Gly Gly Cys Lys Cys Ser Gly Gly Ala Val Val Glu Asn
20 25 30

Ser His Asn Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Asn
35 40 45

Gly Val Val Thr Arg Asn Ala Asn Ala Asn Leu Ala Arg Thr Lys
50 55 60

<210> 6

<211> 63

<212> PRT

<213> *Ruminococcus gnavus*

<400> 6

Met Lys Leu Val Glu Thr Lys Thr Thr Lys Thr Gly Thr Asn Phe Glu
1 5 10 15

Gly Asn Arg Ala Gly Cys Ile Cys Asn Gly Thr Val Ala Val Ala Asn
20 25 30

Ser His Asn Ala Gly Pro Ala Tyr Cys Val Gly Tyr Cys Gly Asn Ser
35 40 45

Gly Val Val Thr Arg Asn Ala Asn Ala Asn Val Ala Lys Thr Ala
50 55 60

<210> 7

<211> 192

<212> ADN

<213> *Ruminococcus gnavus*

<400> 7

atgagaaaaa tcgtagcagg aaagttacag acaggagcag actttgaagg cagcaaatgg 60

ggatgtgttt gtagtggaag cacagcagta gcaaactctc ataatgcagg accggcgtat 120

tgcgtaggat actgtggaaa caacggagta gtgactagaa atgctaatac aaatgtcgca 180

aaaacggcat aa 192

ES 2 461 548 T3

<210> 8
 <211> 192
 <212> ADN
 5 <213> *Ruminococcus gnavus*

 <400> 8
 atgagaaaaa tcgtagcagg aaagttacag acaggagcag actttgaagg cagcaaaggt 60
 ggatgtaaat gcagtggcgg tgcagtagta gaaaactctc ataatgcagg accagcgtat 120
 tgcgtgggat actgtggaaa caacggagtg gtaacaagaa atgcgaatgc gaatcttgca 180
 agaacaaaat aa 192
 10
 <210> 9
 <211> 192
 <212> ADN
 15 <213> *Ruminococcus gnavus*

 <400> 9
 atgaaattag tagaaacaaa aacaacaaa acaggaacaa actttgaagg gaatagagct 60
 ggatgtattt gtaatggcac tgtagcagta gcaaatctc ataatgcagg accagcatat 120
 tgtgttgggt attgcggaaa tagtggagta gtaacaagaa atgcgaatgc aaatgtcgca 180
 20 aaaacagcat aa 192

 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> *Ruminococcus gnavus*

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 30 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 35 <223> Xaa can be Asn or Ser

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 40 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

 <400> 10
 Ala Gly Val Ile Xaa Xaa Gly Thr Xaa Ala Val
 1 5 10
 45
 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 50 <213> *Ruminococcus gnavus*

 <400> 11
 Ala Gly Pro Ala Tyr
 1 5
 55 <210> 12

<211> 11
<212> PRT
<213> *Ruminococcus gnavus*

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

15 <400> 12

Ala	Gly	Xaa	Val	Xaa	Ser	Gly	Ser	Thr	Ala	Val
1				5					10	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido que tiene una actividad antimicrobiana contra las cepas de *Clostridium perfringens*, caracterizado porque comprende un péptido seleccionado de entre los péptidos siguientes:
- el péptido de la secuencia SEC ID nº 1,
 - un péptido que comprende un péptido que presenta por lo menos el 80% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 1,
 - 10 - el péptido de la secuencia SEC ID nº 2,
 - un péptido que comprende un péptido que presenta por lo menos el 80% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 2
- 15 2. Péptido según la reivindicación 1, que comprende además el péptido de la secuencia SEC ID nº 3.
3. Péptido según la reivindicación 1, que comprende un péptido seleccionado de entre los péptidos de las secuencias SEC ID nº 4, 5 o 6.
- 20 4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que presenta un peso molecular comprendido entre 4000 y 4600 Da, tal como se determina por espectrometría de masas.
- 25 5. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, aislado a partir de una cepa de *Ruminococcus gnavus* mutante.
6. Péptido según la reivindicación 5, aislado a partir de la cepa de *Ruminococcus gnavus* depositada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75015 París) el 19 de diciembre de 2006 bajo el número CNCM I-3705.
- 30 7. Polinucleótido que codifica para una actividad antimicrobiana contra las cepas de *Clostridium perfringens*, caracterizado porque comprende un polinucleótido seleccionado de entre:
- el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9,
 - 35 - un polinucleótido que se hibrida de manera selectiva en condiciones de media a fuerte astringencia con el polinucleótido según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 7, 8 o 9,
 - un polinucleótido que codifica para un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 8. Casete de expresión, caracterizado porque comprende, en el sentido de la transcripción:
- un promotor funcional en un organismo hospedante,
 - un polinucleótido según la reivindicación 7, y
 - 45 - una secuencia terminadora en el mismo organismo hospedante.
9. Vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 7 y/o un casete de expresión según la reivindicación 8.
- 50 10. Organismo hospedante transformado con un polinucleótido según la reivindicación 7, un casete de expresión según la reivindicación 8 y/o un vector según la reivindicación 9.
11. Cepa de *Ruminococcus gnavus* depositada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75015 París) el 19 de diciembre de 2006 bajo el número CNCM I-3705.
- 55 12. Mezcla proteica o mosto de fermentación susceptible de ser obtenida mediante un procedimiento de preparación que comprende las etapas siguientes:
- a) cultivo de la cepa según la reivindicación 11 o de un organismo hospedante según la reivindicación 10 en condiciones de inducción de la expresión del péptido, y
 - 60 b) recuperación del sobrenadante de cultivo que comprende el péptido,
 - c) opcionalmente, ruptura de las células y purificación del extracto celular.
- 65 13. Composición que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un organismo

hospedante según la reivindicación 10, una cepa según la reivindicación 11, un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la reivindicación 10 o un mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 11.

5 14. Composición según la reivindicación 13, que se presenta en forma líquida o en forma de polvo.

10 15. Aditivo nutricional que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un organismo hospedante según la reivindicación 10, una cepa según la reivindicación 11, un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la reivindicación 10 o un mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 11.

16. Aditivo nutricional según la reivindicación 15, que se presenta en forma líquida o en forma de polvo.

15 17. Alimento para animales, caracterizado porque comprende una base nutricional para animales y un aditivo nutricional según la reivindicación 15 o 16.

20 18. Utilización de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, de un organismo hospedante según la reivindicación 10, de una cepa según la reivindicación 11, de un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la reivindicación 10 o de un mosto de fermentación de una cepa según la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento, de un aditivo nutricional o de un alimento para animales.

19. Utilización según la reivindicación 18, para la fabricación de un medicamento o de un aditivo nutricional destinado a prevenir o tratar la enteritis necrótica en las aves de corral o en los cerdos.

25 20. Utilización según la reivindicación 18, para la fabricación de un medicamento o de un aditivo nutricional destinado a prevenir o tratar las enfermedades gastrointestinales en el ser humano.

30 21. Utilización según la reivindicación 18, según la cual el péptido procede de una cepa endógena o de una cepa exógena del animal.

22. Utilización según la reivindicación 18, según la cual el péptido procede de una cepa endógena del animal, y según la cual se favorece la producción del péptido por dicha cepa endógena.

35 23. Utilización según la reivindicación 18, según la cual el péptido procede de una cepa endógena del animal, y según la cual se favorece el crecimiento de dicha cepa endógena.

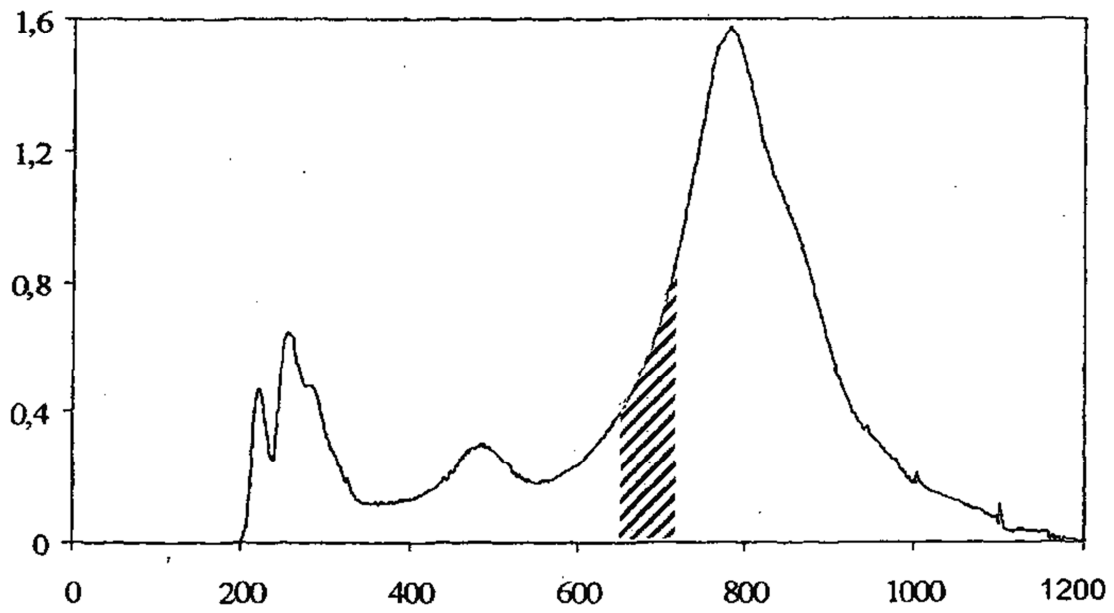


Figura 1

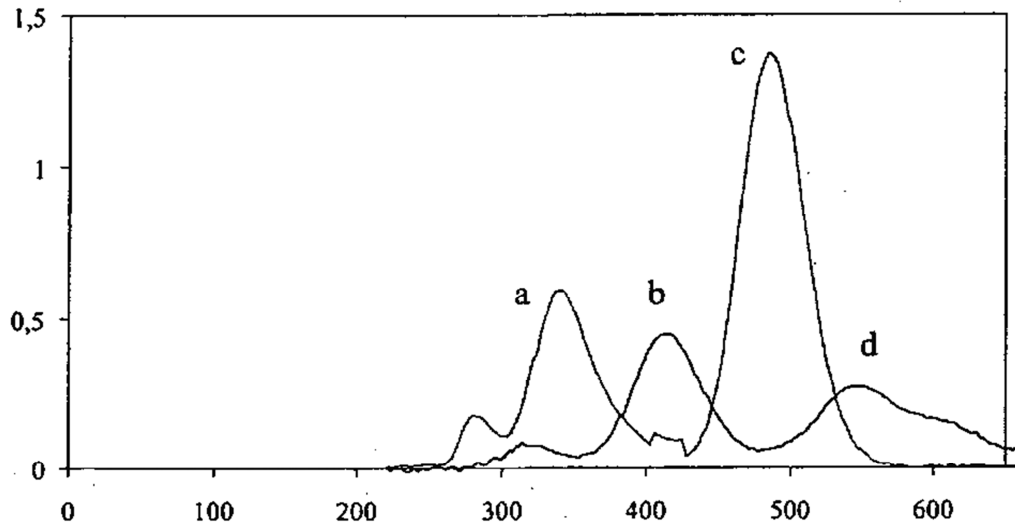


Figura 2A

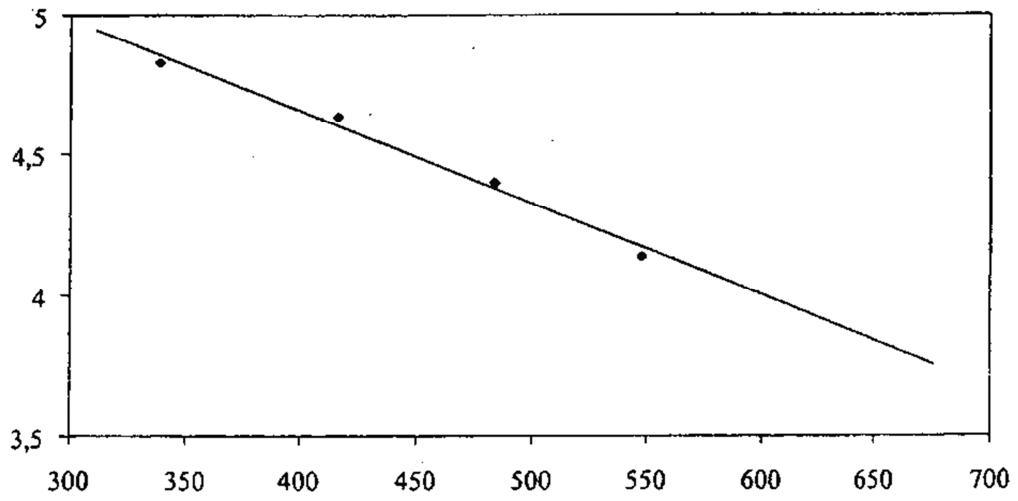


Figura 2B

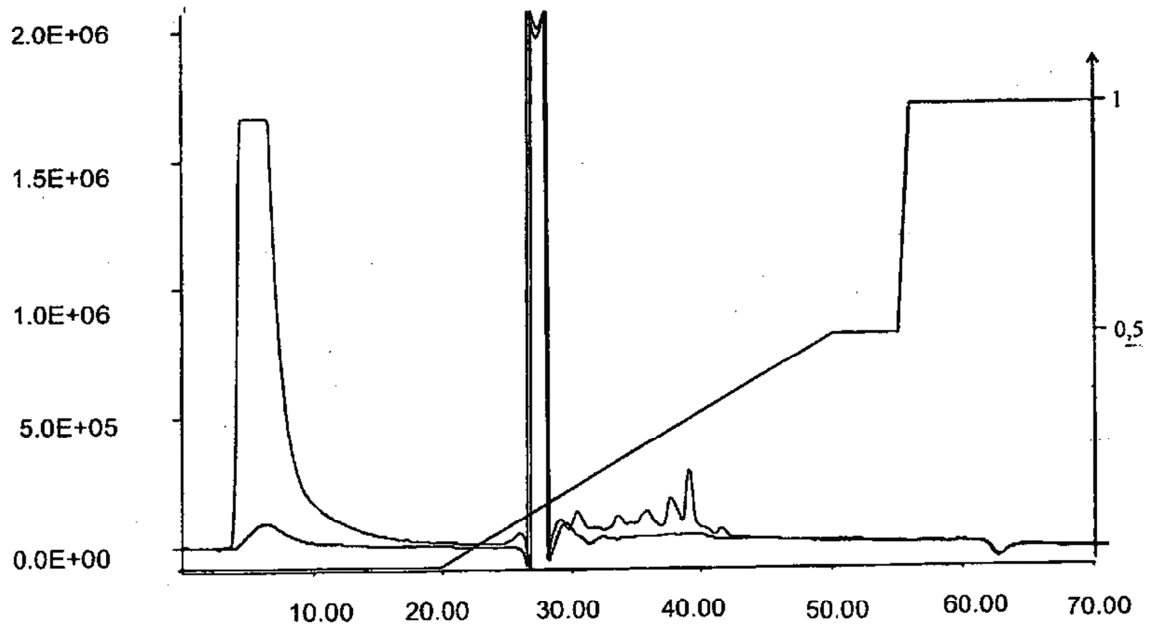


Figura 3

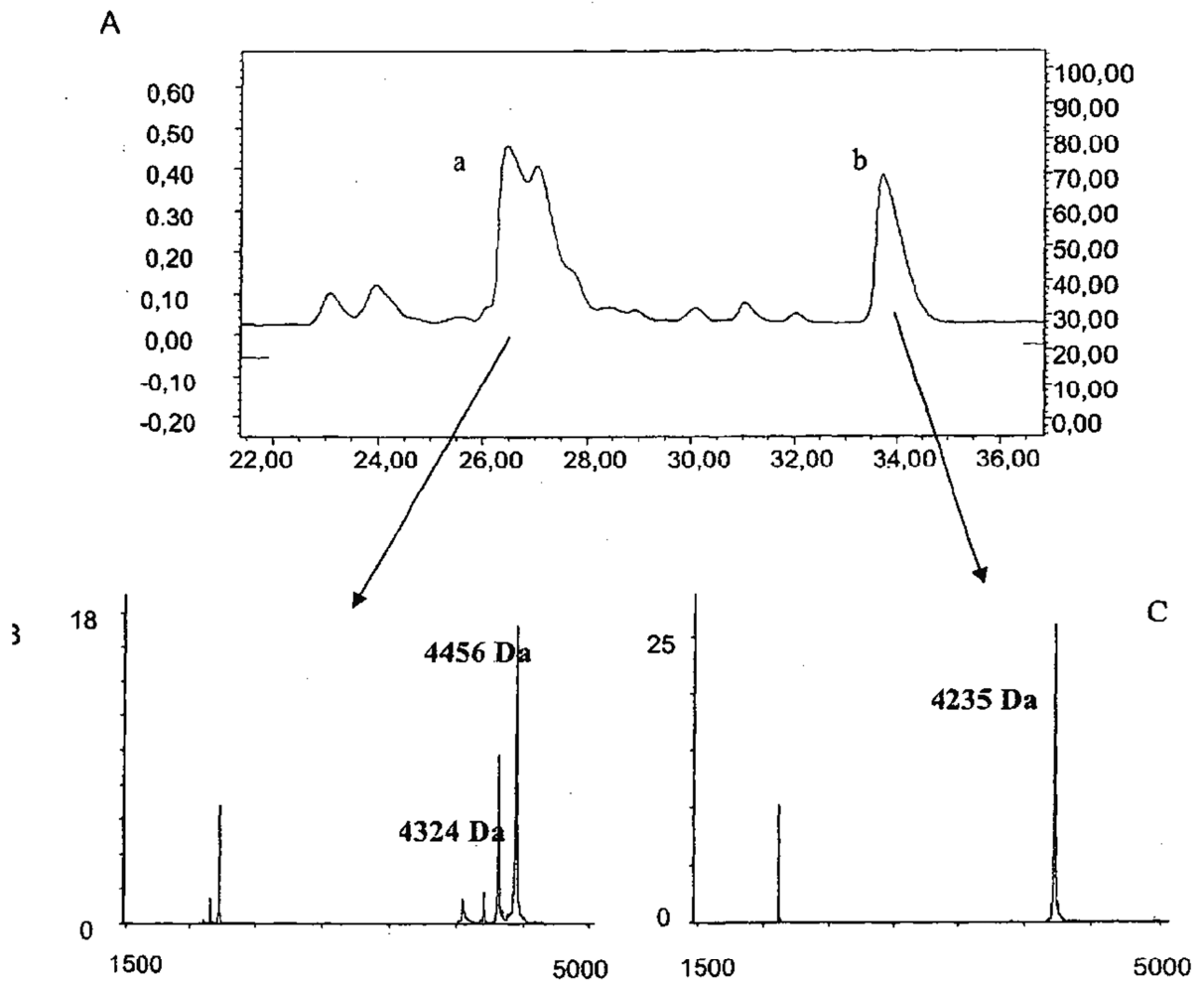


Figura 4

Contenido cecal de rata monoxénica para la cepa E1

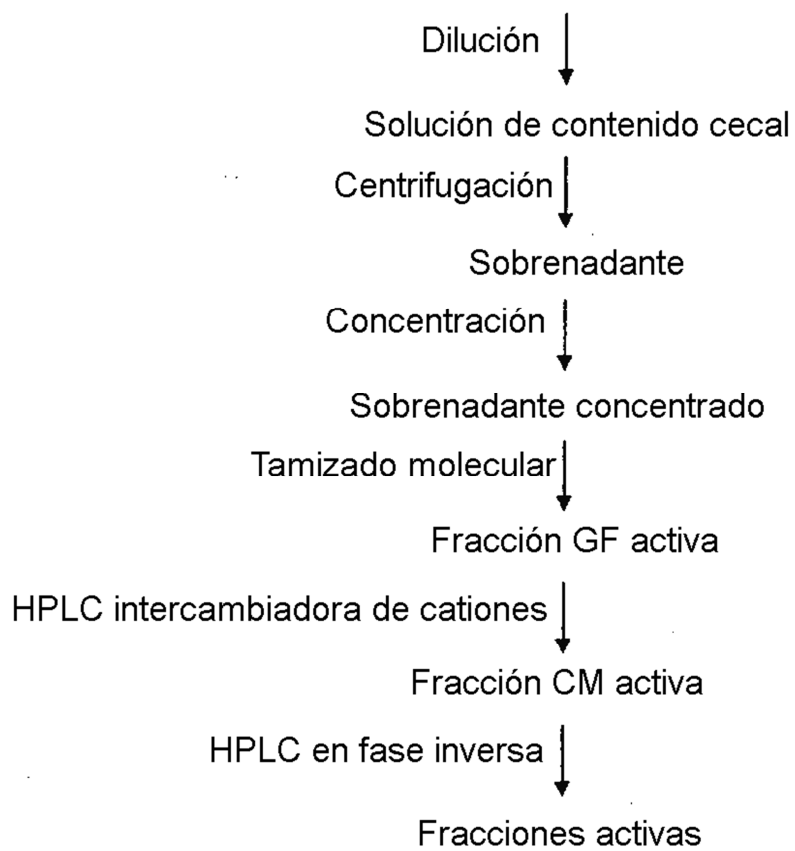


Figura 5

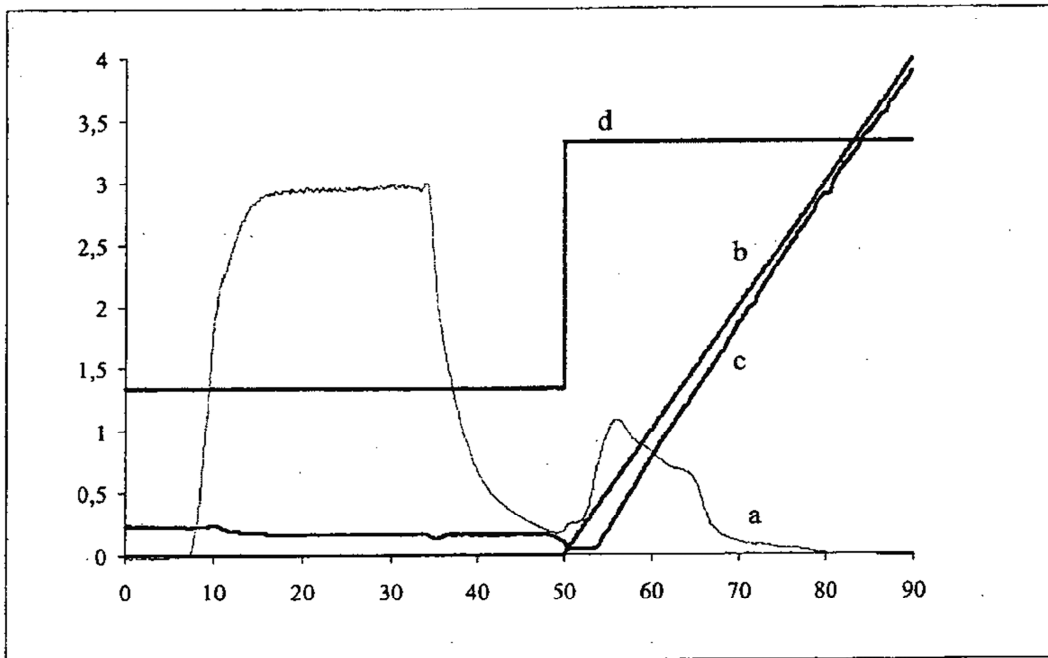


Figura 6

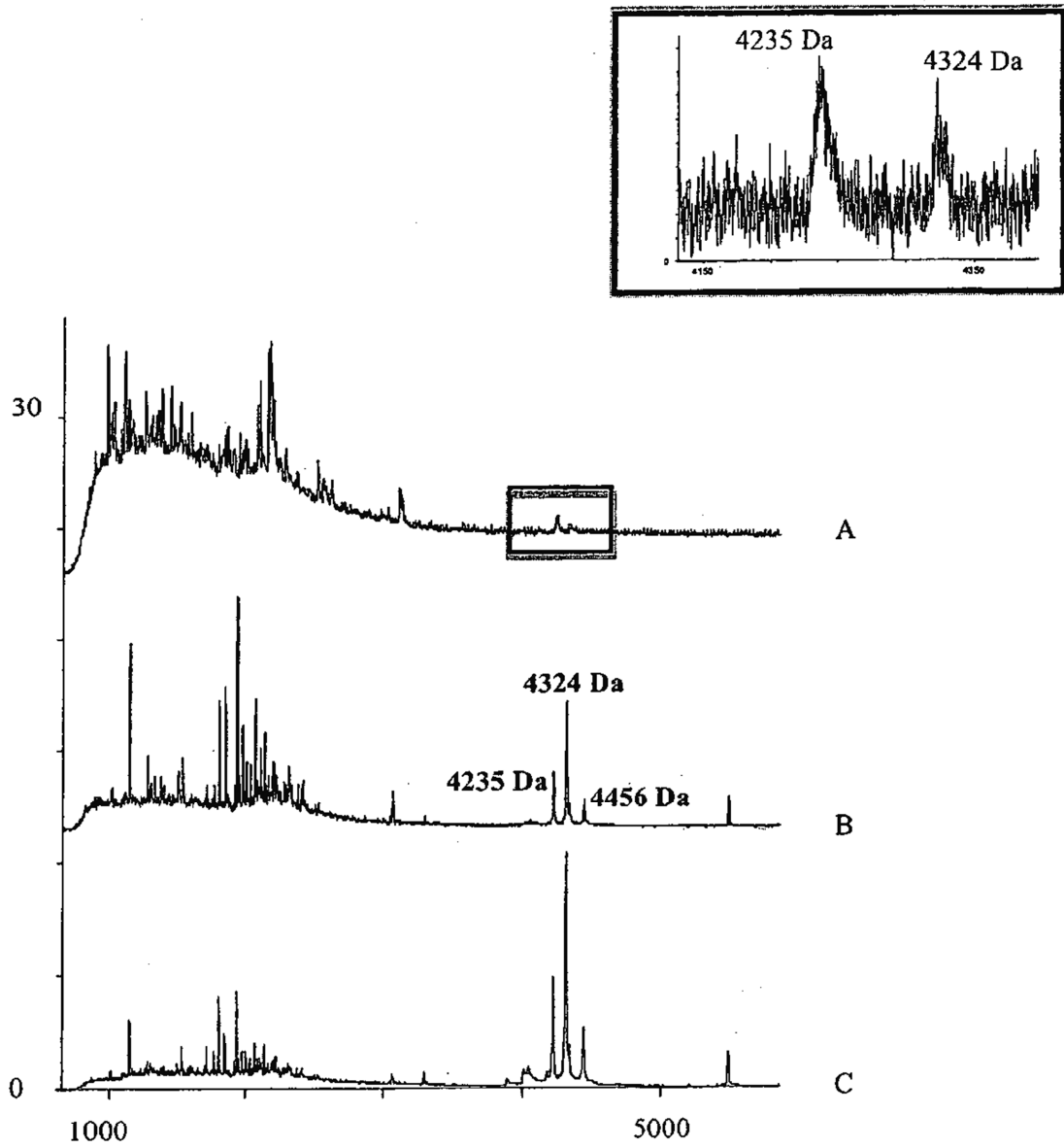


Figura 7

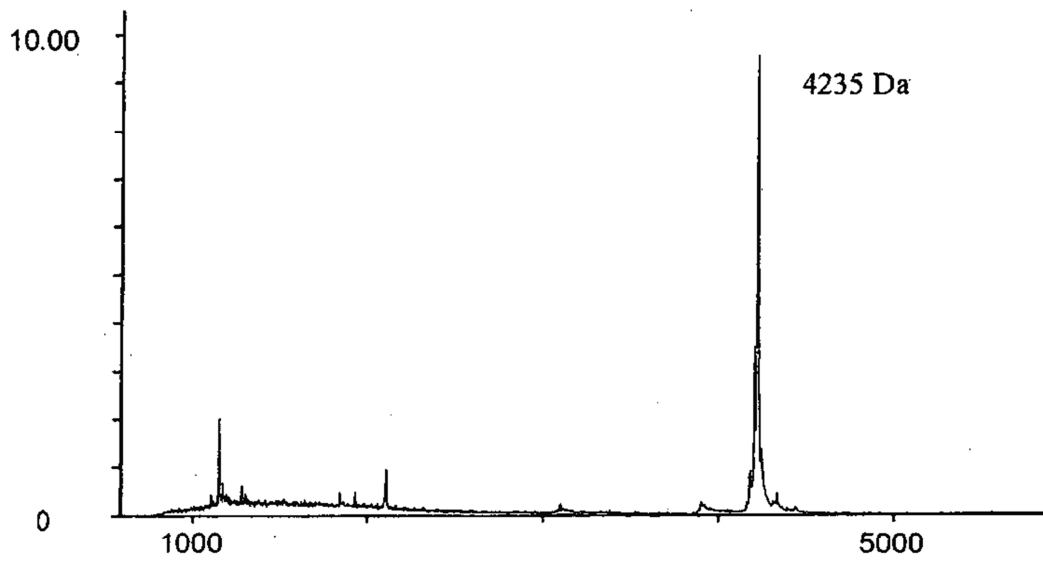


Figura 8

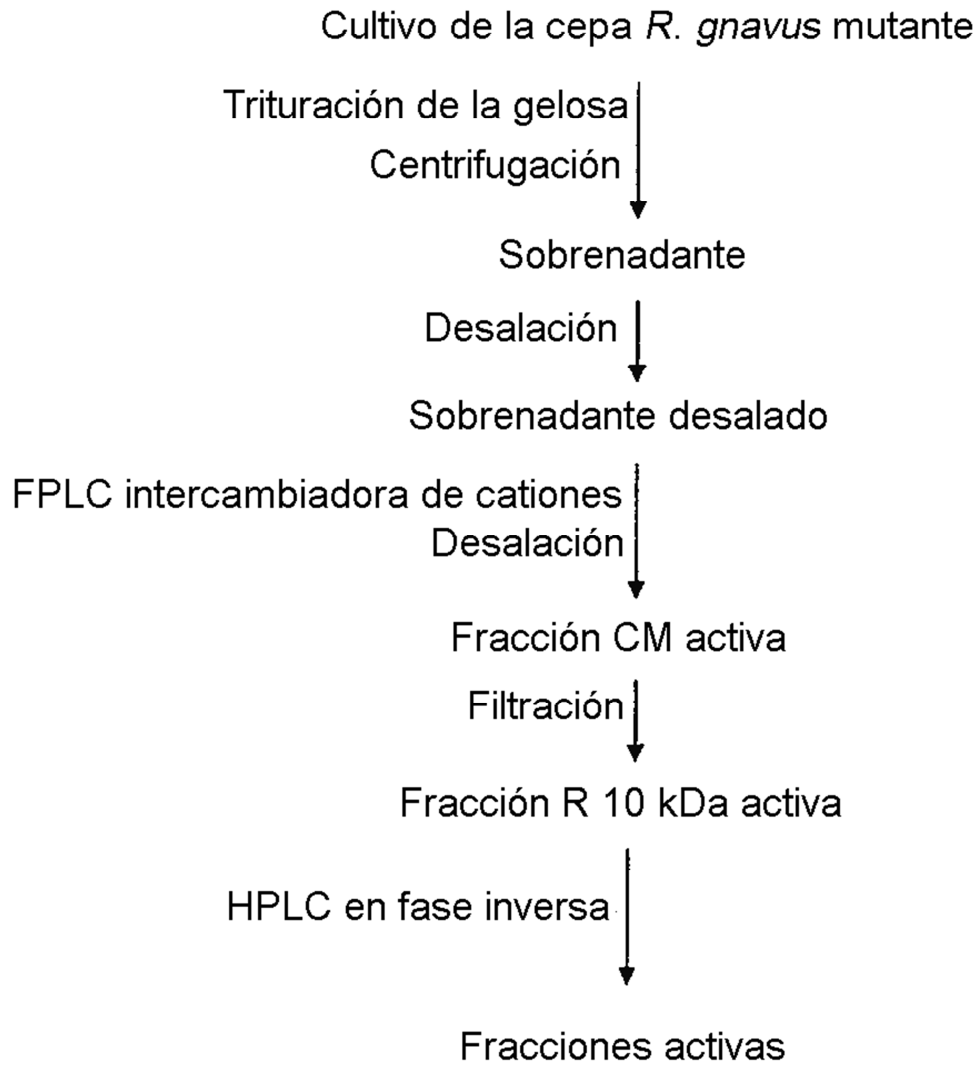


Figura 9