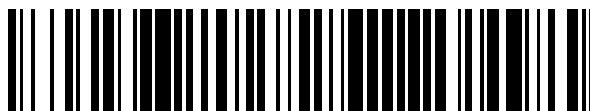


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 277**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2008** **E 12180141 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016** **EP 2522358**

54 Título: **Péptidos contra una infección por rotavirus**

30 Prioridad:

27.06.2007 EP 07111189

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

08.05.2017

73 Titular/es:

LABORATORIOS ORDESA, S.L. (100.0%)

Carretera del Prat 9-11

08830 Sant Boi de Llobregat, Barcelona, ES

72 Inventor/es:

RIVERO URGELL, MONTSERRAT;

FÀBREGA SÁNCHEZ, JOAN;

MORENO MUÑOZ, JOSÉ ANTONIO;

BATALLER LEIVA, ESTHER;

BUESA GÓMEZ, JAVIER;

GENOVÉS MARTÍNEZ, SALVADOR;

RAMÓN VIDAL, DANIEL;

VILLANUEVA ROIG, ADELA y

CASINOS RAMO, BEATRIZ

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 611 277 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 contra una infección por rotavirus

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Bifidobacterium* que tiene actividad anti-rotavirus. Por tanto, la invención se refiere al uso de estos agentes para el tratamiento o la profilaxis de la diarrea producida por rotavirus.

Técnica anterior

10

- [0002]** El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y recibió el nombre de "rota" debido a su doble cápside que se parece a una rueda de carro. Desde que se descubrió se ha confirmado, mediante muchos estudios epidemiológicos realizados en todo el mundo, que el rotavirus es una causa principal de diarrea aguda en bebés y en niños pequeños. Los rotavirus se dividen en 6 grupos antigénicos diferentes (A-F). Los rotavirus del grupo A, B y C se encuentran tanto en seres humanos como en animales, y los rotavirus de los grupos D, E y F solo se encuentran en animales. Los rotavirus del grupo A se distribuyen principalmente entre cepas derivadas de ser humano y los subgrupos se determinan por su proteína de la cápside interna VP6 y los tipos serológicos se determinan por las proteínas de la cápside externa VP7 y VP4. Dentro del grupo A, se han diferenciado 4 subgrupos. Existen al menos 14 serotipos G, de G1 a G14, en base a la antigenicidad de la proteína VP7, y 12 serotipos P, en base a las propiedades antigénicas de la proteína VP4.

- [0003]** Se sabe que los rotavirus son la causa principal de diarrea aguda y enteritis en niños y en animales jóvenes de ganado, caballos, cerdos y monos. La transmisión de la infección se produce principalmente mediante la vía fecal-oral. Los rotavirus producen frecuentemente una diarrea acuosa aguda en niños menores de 5 años.

25

- [0004]** Esta diarrea inducida por rotavirus es el resultado de alteraciones en la absorción de células epiteliales de la mucosa intestinal causadas por la infección viral. Una vez infectados los enterocitos del intestino delgado, el virus prolifera en su citoplasma y ocasiona una disfunción en diversos sistemas de transporte (iones y/o solutos y agua). Las células dañadas sufren descamación y desprenden hacia el exterior el virus en el lumen intestinal, de tal manera que el virus puede encontrarse en las heces. Cuando los rotavirus se replican, las células de las vellosidades dañadas se reemplazan por células inmaduras de la cripta que no tienen capacidad de absorción, produciendo una mala absorción del sodio y la glucosa, lo que da como resultado la diarrea. Además, se ha identificado una proteína de rotavirus no estructural, la NSP4, como una enterotoxina viral. La NSP4 aumenta los niveles de calcio intracelular y afecta a la permeabilidad de las membranas plasmáticas, produciendo una salida de cloro, sodio y agua, induciendo por lo tanto una diarrea secretora.

- [0005]** La Organización Mundial de la Salud calcula que cinco millones de niños menores de 5 años mueren de diarrea cada año, y el 20 % de ellos mueren por diarrea inducida por rotavirus. La diarrea inducida por rotavirus prevalece durante el invierno y es una de las causas principales de mortalidad infantil en países desarrollados. La mejor medida para prevenir la enfermedad es la lactancia materna. Dado que la leche de la madre contiene IgA que actúan contra rotavirus, la lactancia materna puede impedir la diarrea infantil causada por rotavirus.

- [0006]** En los últimos años las investigaciones se han centrado en el posible uso de agentes probióticos. Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren al hospedador un beneficio saludable. Los beneficios que se conocen sobre la administración enteral de microorganismos probióticos incluyen defensa potenciada del hospedador contra la enfermedad mejorando las propiedades de la microflora endógena y aumento de la resistencia a la colonización contra la microflora perjudicial. Se ha sugerido que los probióticos desempeñan una importante función en la formación o establecimiento de una microflora intestinal bien equilibrada, indígena, en niños recién nacidos o en adultos que reciben altas dosis de antibióticos. Se han recomendado bacterias acidolácticas, especialmente cepas específicas de *Lactobacillus* y de especies de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* para su uso como probióticos.

- [0007]** Desde 1960 el género bacteriano *Lactobacillus* se ha estudiado frecuentemente en niños con respecto a sus propiedades antidiarreicas. Estudios publicados en la bibliografía mundial han llegado a la conclusión de que el *Lactobacillus* es de hecho inocuo y eficaz en el tratamiento y prevención de la diarrea infecciosa, diarrea asociada con antibióticos y diarrea en niños que son muy susceptibles como resultado de una mala nutrición, estado inmunitario alterado, o frecuente exposición a patógenos. A pesar de estos informes, médicos de los Estados Unidos no recomiendan rutinariamente el uso *Lactobacillus*, pensando quizás que su eficacia aún no se ha probado (consúltese, C.W. Christakis et al., "*Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: A meta-analysis" Pediatrics 2002, vol. 109, págs. 678-84). J.M. Saavedra et al., "Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus" Lancet 1994, vol. 344, págs. 1046-9, analizaron una fórmula con *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus* con niños hospitalizados.

- 65 **[0008]** Diversos estudios han mostrado la eficacia de otros agentes probióticos, incluyendo *Lactobacillus*

rhamnosus GG (LGG), en la prevención de la diarrea. Diversos ensayos clínicos pediátricos mostraron la eficacia del LGG en el tratamiento de la gastroenteritis por rotavirus (consúltese, Guandalini et al., "Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European study", J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2000, vol. 30, págs. 54-60).

5

[0009] Se han propuesto otras estrategias para el tratamiento de la diarrea, por ejemplo:

[0010] El documento EP 1571213 A1 desvela una nueva cepa de *Bifidobacterium longum* AR81 (KCCM-10492) y una proteína activa separada de la cepa con la secuencia de 10 aminoácidos HLDLAVENT, que tiene actividad
10 inhibidora de rotavirus.

[0011] Todos los ejemplos y datos que figuran en el documento EP 1571213 A1 se realizan con una proteína citoplasmática, una proteasa presente en las células. Por tanto, para obtener el ingrediente activo en primer lugar las células deben procesarse (lisarse) para obtener los componentes citoplasmáticos o los componentes de la pared
15 celular.

[0012] El documento JP 08259597 desvela una proteína preparada a partir del cultivo de la cepa SBT 2928 de *Bifidobacterium longum* capaz de interferir con la adhesión de patógenos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.) a la asialo-GM1. La proteína presenta un peso molecular de 10,4 kDa (filtración en gel) o de 52
20 kDa (SDS-PAGE) y un pl de 5,8. Sus aminoácidos N-terminales se definen como VDPHAIVPSNFDFAFL.

[0013] El documento EP 1353681 A1 describe el uso de la cepa CNCM-2168 de *Bifidobacterium* para prevenir la infección de células intestinales por rotavirus.

25 **[0014]** El documento WO 2003010297 A1 describe cepas probióticas de *Bifidobacterium*, AH208, AH209, AH210, AH211, AH212 o AH214, y su uso en el tratamiento de diversas enfermedades.

[0015] El documento WO 0042168 A1 describe una cepa de *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium longum infantis* UCC35624) con efectos significativamente inmunomodulares, útiles en la profilaxis y/o tratamiento de la actividad
30 inflamatoria no deseable, especialmente actividad inflamatoria gastrointestinal tal como enfermedad inflamatoria intestinal o síndrome del intestino irritable.

[0016] El documento US 5922375 describe una cepa de *Bifidobacterium longum* (JBL 28-1/3300) y su uso contra la diarrea.
35

[0017] Por otro lado, el documento EP1359157 desvela péptidos derivados de caseína, obtenidos por hidrólisis de caseína por *Lactobacillus helveticus* y que tienen el efecto de inhibir una metaloproteinasa. Los péptidos se usan en productos alimenticios para la inhibición de metaloproteinasas de la matriz y por lo tanto se aplican para la inhibición de invasión y metástasis cancerosa, ulceración tisular, artritis y periodontitis, así como para la inhibición de
40 osteoclastos.

[0018] El documento WO 0230958 desvela el decapeptido de secuencia HQPHQPLPPT que, una vez aislado por hidrólisis enzimática de caseína bovina, influye en el crecimiento de una línea de células de insecto (en concreto la línea de células de insecto IPLB-Sf-21).
45

[0019] Hay una necesidad urgente, tanto en el mundo desarrollado como en países endesarrollado, de productos y métodos que sean eficaces en el tratamiento de la diarrea infecciosa, y específicamente la diarrea causada por infección por rotavirus o asociada con terapia con antibióticos.

50 Sumario de la invención

[0020] El problema a resolver por la presente invención es el suministro de agentes con actividad anti-rotavirus y por tanto, eficaces para el tratamiento de la diarrea.

55 **[0021]** Durante los intensos estudios que condujeron a la presente invención los inventores han investigado diferentes cepas bacterianas aisladas de heces de bebés alimentados con leche materna. Se examinaron diferentes cepas con respecto a su capacidad para prevenir la infección de células intestinales con rotavirus que se sabe que producen diarrea.

60 **[0022]** La solución se basa en la cepa de *Bifidobacterium longum* biovariedad *infantis* depositada con el Número de registro CECT 7210.

[0023] Como se ilustra más adelante, de una manera no limitada, los inventores han descubierto que la cepa de *Bifidobacterium longum* biovariedad *infantis* de la presente invención es eficaz para la protección contra infección por
65 rotavirus. La cepa de la invención ha demostrado ser particularmente útil para la inhibición de la replicación de

diversas cepas de rotavirus. El efecto inhibidor se obtiene tanto con las células probióticas intactas como con los sobrenadantes de cultivos de la cepa que crece en presencia de caseína. El efecto se observa con células probióticas completas intactas, no siendo necesario la lisis de las células probióticas para observar el efecto inhibidor. Esto hace que la cepa de la invención sea útil en composiciones y productos en los que la cepa está en forma entera/viva. La cepa de la invención es activa contra infecciones por diarrea debido al efecto en la potenciación de la respuesta inmunitaria y también debido a la presencia de péptidos en el sobrenadante dando como resultado la fermentación de la cepa.

[0024] Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una cepa de *Bifidobacterium longum* biovariedad *infantis* depositada en la "Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)" con el número de registro CECT 7210, o un mutante de la misma que tiene una actividad de inhibir la infección por rotavirus y que tiene la capacidad de producir un péptido a partir de la fermentación de la β -caseína de la leche de vaca, teniendo dicho péptido una longitud de 11 a 17 aminoácidos y una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 1. La cepa CECT 7210 se depositó el 20 de noviembre de 2006.

[0025] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un cultivo bacteriano que comprende la cepa de la invención.

[0026] Un tercer aspecto de la invención se refiere a una preparación bacteriana que comprende la cepa de la invención.

[0027] Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende una cantidad nutricionalmente eficaz de la cepa de la invención, junto con cantidades apropiadas de otros ingredientes comestibles.

[0028] En un quinto aspecto, la invención se refiere a una composición nutricional que comprende una cantidad nutricionalmente eficaz de la cepa de la invención, junto con cantidades apropiadas de otros ingredientes comestibles.

[0029] En un sexto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa de la invención, junto con cantidades apropiadas de excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0030] Un séptimo aspecto de la invención se refiere a la cepa como se define anteriormente, para su uso como un probiótico.

[0031] Otros aspectos de la presente invención se refieren al uso de la cepa de la invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de la diarrea en un animal, incluyendo un ser humano, o para la fabricación de un producto alimenticio, o de una composición nutricional.

[0032] Otro aspecto se refiere al uso de la cepa de la invención para la preparación de un péptido que tiene una longitud de 11 a 17 aminoácidos y una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

[0033] Como alternativa la invención puede formularse como un método para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de la diarrea, en un animal que incluye un ser humano, que comprende administrar a dicho animal que lo necesite una cantidad eficaz de la cepa de la invención. El tratamiento de la diarrea se amplía a diarrea causada por virus gastrointestinales, tales como norovirus, rotavirus y astrovirus, o por patógenos microbianos, tales como miembros de los géneros *Escherichia*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*. El tratamiento de la invención es particularmente útil para la diarrea causada por infección por rotavirus.

[0034] Finalmente, la invención se refiere a un proceso para la preparación de un péptido como se ha definido anteriormente, o de una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo el proceso la fermentación de la β caseína de leche de vaca, que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 1, con la cepa de la invención, y opcionalmente aislar el péptido y convertirlo en una sal farmacéuticamente aceptable.

[0035] Éstos y otros objetos de la presente invención se describirán adicionalmente en la sección de descripción detallada más adelante, y no pretenden limitar la presente invención. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente argumento tienen el mismo significado al normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece esta invención. Los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretende excluir otras características, aditivos, componentes o etapas técnicas. Otros objetos, ventajas y características de la invención se pondrán de manifiesto para los expertos en la técnica después de examinar la descripción o pueden adquirirse a través de la realización práctica de la invención.

Descripción detallada de realizaciones particulares

[0036] En las siguientes secciones se describe la caracterización detallada de la cepa de la invención y los péptidos aislados del sobrenadante de la cepa después de la fermentación, y su actividad anti-rotavirus.

5 **[0037]** Como se usa en la técnica, el término “microorganismo” se refiere a organismos que son microscópicos e incluyen bacterias, levaduras, hongos, arqueas o protistas. En el presente documento, el término “bacteria” se usa, al igual que en la técnica, para indicar un microorganismo unicelular que es procariota, es decir, que carece de un núcleo y orgánulos delimitados por una membrana. El término “probiótico” se refiere a bacteria en el contexto de
10 complementos dietéticos. Generalmente, el término probiótico se refiere a complementos dietéticos que contienen bacterias o levaduras posiblemente beneficiosas, siendo las bacterias acidolácticas los microbios más comunes usados. La expresión “cantidad eficaz”, como se usa en el presente documento, significa una cantidad de un ingrediente activo lo suficientemente alta como para administrar el beneficio deseado, pero lo suficientemente baja como para impedir que se produzcan efectos secundarios graves dentro del ámbito del criterio médico. La expresión
15 “farmacéuticamente aceptable” como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc., también debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la
20 formulación. Vehículos, excipientes, etc. adecuados pueden encontrarse en textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

[0038] El ámbito de la presente invención también incluye bacterias obtenidas por mutación de la cepa *Bifidobacterium longum* biovariedad *infantis* CECT 7210, siempre que las bacterias resultantes tengan la actividad
25 de inhibir rotavirus. En realizaciones particulares de la invención, el mutante es un mutante modificado genéticamente obtenido por mutagénesis clásica (es decir, usando agentes químicos o físicos) o por técnicas de modificación por ingeniería genética.

[0039] El uso general de la cepa de la invención es en forma de células viables. Esto significa la introducción de
30 las bacterias vivas en una composición no fermentada. De esta manera, la administración de dichas composiciones permite que se produzca la actividad anti-rotavirus en el tracto gastrointestinal individual.

[0040] Sin embargo, la invención también puede ampliarse a células no viables en composiciones que comprenden factores beneficiosos expresados por la cepa en un proceso previo. En particular, en la presente
35 invención, esto puede ser el resultado de exponer la cepa de la invención a fermentación en un medio adecuado de tal manera que pueda producirse el péptido producido por la cepa de la invención. Son medios adecuados para la producción del péptido producido por la cepa de la invención los medios basados en leche de vaca que comprenden β -caseína pero en la producción del péptido también son eficaces otras composiciones de medios que comprendan β -caseína de leche de vaca. Por tanto, el individuo ingiere el producto fermentado que comprende el péptido
40 producido por la cepa de la invención y las células no viables resultantes del proceso de fermentación. Las composiciones pueden comprender una combinación de células no viables y viables.

[0041] En este sentido, una realización de la presente invención es una preparación bacteriana que comprende la cepa de la invención en forma de píldoras, cápsulas o polvo liofilizado para administrar directamente.
45

[0042] En otras realizaciones, la cepa de la invención puede usarse para la preparación de diversos productos alimenticios, tales como productos lácteos, un yogur, una cuajada, un queso (por ejemplo, queso batido (quark), cremoso, procesado, blando y duro), una leche fermentada, una leche en polvo, una leche basada en producto fermentado, un helado, un producto basado en cereal fermentado, un polvo basado en leche, una bebida, un postre,
50 y un alimento para mascotas. Ejemplos de otros productos alimenticios son productos cárnicos (por ejemplo, pasta de hígado, salchichas Frankfurt y salami o pastas de carne para untar), pastas de chocolate para untar, rellenos (por ejemplo, trufa, crema) y merengues, chocolate, golosinas (por ejemplo, caramelo, dulce de caramelo o toffee), productos de panadería (galletas, pasteles), salsas y sopas, zumos de fruta y blanqueadores de café. Sin embargo, la expresión “producto alimenticio” se usa en el presente documento en su amplio significado, incluyendo cualquier
55 tipo de producto, en cualquier forma de presentación, que pueda ingerir un animal.

[0043] En otras realizaciones, la cepa de la invención puede usarse para la preparación de diversas composiciones nutricionales. Son realizaciones particulares un complemento dietético, un aditivo y una fórmula láctea infantil. Los complementos dietéticos están destinados a aportar nutrientes (vitaminas, minerales, ácidos
60 grasos o aminoácidos) que se pierden o que una persona no consume en cantidades suficientes en la dieta (niños, gestantes, personas de avanzada edad, etc.). En una realización particular, la cepa de la invención está homogeneizada con otros ingredientes, tales como cereales o leche en polvo para constituir una fórmula láctea infantil.

[0044] En dichos productos y composiciones, la cepa está presente en una cantidad de aproximadamente 10^5
65

ufc/g a aproximadamente 10^9 ufc/g de la composición, y preferentemente en una cantidad de 10^7 ufc/g de acuerdo con la actual legislación. Para los fines de la presente invención, la abreviatura “ufc” designará una “unidad formadora de colonias” que se define como el número de células bacterianas revelado por recuentos microbianos en placas de agar. Dependiendo del producto, las bacterias serán vivas o no viables.

- 5 **[0045]** La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cepa de la invención. En este sentido, la composición farmacéutica puede prepararse en forma de comprimidos, complementos orales deshidratados, alimentación seca por sonda, etc., estando incluida la cantidad de bacterias a incorporar en el intervalo de 10^7 ufc/g a aproximadamente 10^{11} ufc/g de producto y preferentemente una cantidad de 10^9 ufc/g.
- 10 Dependiendo del objetivo deseado, el experto en la técnica seleccionará los excipientes y/o vehículos apropiados. *Bifidobacterium* no es estable en forma líquida, por tanto se prefieren preparaciones deshidratadas.

- [0046]** En general, las composiciones pueden comprender las bacterias de la invención como un solo agente probiótico contra la diarrea, como combinaciones de dichos probióticos o como combinaciones con otros agentes terapéuticos/nutracéuticos dependiendo de la afección.
- 15

- [0047]** En una realización particular, la secuencia peptídica de aminoácidos producida por la cepa de la invención se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-16: En una realización más particular, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos MHQPHQLPPT (SEC ID N°: 1) y un peso molecular de 1286,63 Da. En otra realización, el péptido tiene 13 aminoácidos, un peso molecular de 1513 Da y una secuencia MHQPHQLPPTVM (SEC ID N°: 3). Estas secuencias corresponden a fragmentos de β -caseína de la leche de vaca. Otros péptidos con una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 1 y producida por la cepa de la invención pueden ser útiles para los fines de la invención (SEC ID N°: 2, 4-16).
- 20

- 25 **[0048]** La invención se refiere a un proceso para la preparación de los péptidos descritos anteriormente, que comprende fermentar la β -caseína de la leche de vaca, que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 1, con una cepa de la invención y opcionalmente aislar el péptido y/o convertirlo en una sal farmacéuticamente aceptable.

- 30 **[0049]** Las siguientes secciones describen la caracterización de la cepa de la invención, la caracterización de los péptidos aislados del sobrenadante de la cepa de la invención después de la fermentación y la actividad anti-rotavirus de la cepa y los péptidos.

1. Aislamiento de microorganismos

- 35 **[0050]** Se disolvió 1 g de heces de bebés alimentados con leche materna en tampón PBS (tampón fosfato pH 7,0) homogeneizando la muestra por maceración durante 3 minutos en un stomacher (Bagmixer 400P, Interscience Worlwide, Francia). Se incubó 1 ml de alícuota del homogeneizado en caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) complementado con 0,05 % (p/v) de cisteína (MRS-C; Sigma, St. Louis, Mo) a pH 3,0 con HCl durante 17 h a 37 °C en condiciones anaerobias. Alícuotas de esta preincubación se sembraron en placas a diferentes diluciones en un medio general de MSR-C y dos medios selectivos para *Bifidobacterium*: BSM (BSM, Fluka, Buchs, Suiza) y BFM (BFM; Y. Nebra et al., “A new selective medium for *Bifidobacterium* spp.” Applied and Environmental Microbiology, 1999, vol. 65, págs. 5173-6) y se incubaron durante 36 a 72 h. La morfología de la colonia y el tipo de pared celular de las cepas obtenidas se determinaron por tinción Gram. Con este protocolo, las bacterias resistentes a pH ácido se seleccionan por preincubación de las muestras de heces en MRS-C líquido durante 17 h a pH 3,0. De todas las cepas obtenidas, se seleccionaron 30 aislados para sembrar simultáneamente en placas de medio de *Lactobacillus* (MRS-C) y en medios selectivos de *Bifidobacterium* (BSM y BFM). Se observó que un 70 % pertenecía al género *Bifidobacterium* a diferencia del 30 % que pertenecía al género *Lactobacillus*.
- 40
- 45

- 50 **[0051]** Algunas cepas se seleccionaron para la caracterización. Los siguientes resultados son para la cepa seleccionada de la invención, *Bifidobacterium longue* biovariedad *infantis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 7210.

2. Caracterización taxonómica de la cepa CECT 7210 por secuenciación

- 55 **[0052]** Casi toda la secuencia del ARNr 16S se amplificó y se secuenció usando un Kit de Reacción de Ciclo de Secuenciación Rápido BigDye Terminador de ABI PRISM. Se comprobó la pureza del ADN usando procedimientos convencionales.

- 60 **[0053]** Los moldes de ADN se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador usando cebadores universales que amplifican una región de 1000 pb del gen de ARNr 16S, 616V: 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' (SEC ID N°: 17), 699R: 5'-RGGGTTGCGCTCGTT-3' (SEC ID N°: 18). La mezcla de amplificación (100 μ l) comprendía 2 μ l (50 pmol/ μ l) de cada uno de los cebadores 616V y 699R, 0,5 μ l (2 U/ μ l) de Taq ADN Polimerasa (Finnzymes), 10 μ l de tampón de reacción 10x (Finnzymes), 10 μ l de mezcla de dNTP (que

contenía 1 mM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP, Roche), 70 µl de agua filtrada estéril (Milli-Q purification system, Millipore) y 5,5 µl de molde de ADN. Los moldes de ADN se amplificaron por desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 55 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los controles, sin ADN, se incluyeron simultáneamente en el proceso de amplificación. Se evaluó la integridad de los productos de la PCR mediante el revelado de bandas sencillas después de la electroforesis durante 1 h a 100 V en geles de agarosa al 2 % (p/v) en tampón de Tris-borato EDTA.

[0054] Los amplicones se purificaron usando un kit comercial y se realizaron reacciones de secuenciación posteriores usando el kit de Ciclo de Secuenciación Big Dye Terminador v3.1, formato premezclado. Los cebadores de secuenciación eran los mismos que se utilizaron en la reacción de amplificación pero diluidos diez veces (5 pmol). Las secuencias resultantes se alinearon automáticamente y después se inspeccionaron visualmente. Las secuencias génicas resultantes del ARNr 16S se compararon con las del NCBI utilizando la herramienta de búsqueda BLAST.

[0055] La secuencia obtenida fue como se describe en SEC ID N°: 19 y se correlaciona con la identificación de la cepa CECT 7210 como *Bifidobacterium longum* biovariedad *infantis*.

3. Caracterización fisiológica de la cepa CECT 7210 para su uso como probiótico

3.1. Resistencia a jugos gastrointestinales

[0056] Se prepararon jugos gástricos y pancreáticos inmediatamente antes de su uso, resuspendiendo, en solución salina estéril al 0,5 % (p/w), pepsina de membrana mucosa de estómago de cerdo (3 g/l) y pancreatina de páncreas de cerdo (1 g/l). La cepa bacteriana creció durante 24 h a 37 °C en condiciones anaerobias, se lavó dos veces en solución salina al 0,5 % y se llevó a un inóculo de 10^8 - 10^9 ufc/ml. El ensayo emuló las condiciones y el tiempo de exhibición a los que se someten las bacterias en su paso por el tracto gástrico e intestinal en dos fases. La primera fase consistía en la simulación del paso por el tracto gástrico, para lo cual se preparó un inóculo del 1 % (v/v) de las bacterias en 10 ml de solución salina con pepsina ajustado a un pH de 3,0 con HCl e incubando a 37 °C en condiciones anaerobias durante 120 min. La segunda fase consistía en la simulación del paso por el tracto intestinal, para lo cual las células se neutralizan lavándolas con un tampón fosfato (PBS) a un pH de 7,0 y se resuspendieron en la solución salina con la pancreatina ajustada a un pH de 8,0 con NaOH e incubando a 37 °C en condiciones anaerobias durante 240 min. Las muestras se tomaron a los 0/90/120 minutos en la primera fase y a los 0/60/240 minutos en la segunda, preparando, en cada caso, diluciones en serie, sembrando 100 µl de cada dilución por placa de medio sólido MRS-C e incubando durante dos días a 37 °C en condiciones anaerobias. Como control de viabilidad a lo largo del proceso, la cepa se inoculó en solución salina y se incubó en las mismas condiciones tomando alícuotas al inicio, después de 120 minutos y al final del ensayo.

[0057] Después de la incubación, las bacterias se recuperaron en placas con MRS-C y se realizaron recuentos viables después de 48 h de incubación. La cepa CECT 7210 mostró una pérdida de viabilidad después de la exposición a los jugos, similar a la obtenida usando otros probióticos comerciales. El porcentaje de viabilidad se calculó como la relación entre el número de células viables obtenido en cada una de las fases del ensayo por el número de células viables en el tiempo cero (inóculo 10^7 - 10^8 ufc/ml).

TABLA 1. Efecto *in vitro* de los jugos gastrointestinales en la viabilidad de la cepa CECT 7210

Inóculo ufc/ml	Pepsina pH 3, 120 min		Pancreatina pH 8, 240 min	
	recuento	% viable	recuento	% viable
$1,6 \times 10^8$	$5,5 \times 10^6$	3,4 %	$3,10 \times 10^5$	0,2 %

3.2. Perfil de sensibilidad a antibióticos

[0058] La sensibilidad de la cepa CECT 7210 a antibióticos se determinó mediante técnicas de difusión en agar usando discos impregnados con diferentes concentraciones de antibióticos. Las bacterias crecieron en MRS-C líquido a 37 °C durante 24 h, se recogieron lavándolas varias veces con solución salina y ajustando el inóculo a 10^9 ufc/ml ($DO_{600} = 5$). En estas condiciones se tomaron 100 µl de la suspensión celular y se sembraron en 10 ml de agar MRS-C semisólido al 0,7 % (p/v) a 50 °C. Este agar se derramó sobre una placa de MRS-C y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez seco, los discos con antibióticos se colocaron sobre la superficie. Después de 24 h de incubación en condiciones anaerobias, se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición. Para observar la resistencia o sensibilidad de la cepa, se ensayó un total de 16 antibióticos (TABLA 2).

TABLA 2. Resistencia a antibióticos para la cepa CECT 7210. Valores expresados en mml de halo inhibición

Antibiótico	Cepa CECT 7210
Amoxicilina (25 µg)	25
Carbenicilina (100 µg)	32
Oxacilina (1 µg)	0
Penicilina (6 µg)	30
Vancomicina (30 µg)	0
Cloramfenicol (30 µg)	21
Eritromicina (15 µg)	26
Gentamicina (10 µg)	0
Kanamicina (30 µg)	0
Tetraciclina (30 µg)	30
Metronidazol (5 µg)	0
Ácido nalidíxico (30 µg)	0
Rifampicina (5 µg)	33
Trimetoprim (5 µg)	12
Polimixina B (300 UI)	0
Sulfonamida (200 µg)	0

3.3. Resistencia a sales biliares, a NaCl y a pH ácido

- 5 **[0059]** Se analizó la resistencia de la cepa CECT 7210 a diferentes concentraciones de sales biliares Oxgall, NaCl y pH. El ensayo se basó en la monitorización del crecimiento de las bacterias en placas de 96 pocillos. A cada pocillo se añadieron 100 µl de un inóculo a una $DO_{600} = 1$ y 175 µl de medio MRS-C complementado con Oxgall (p/v) al 0 %, 0,5 %, 1 %, 2 % y 3 %, medio MRS-C complementado con NaCl (p/v) al 0 %, 2 %, 3 %, 6 %, 8 % y 10 % o MRS-C a pH 6,2, pH 3,0, pH 2,0 y pH 1,5. El crecimiento se analizó a 655 nm en un lector de microplacas durante
- 10 24 h de incubación a 37 °C en condiciones anaerobias. Los resultados mostraron que la cepa CECT 7210 era capaz de crecer en presencia de diferentes concentraciones de sales biliares, no encontrándose diferencias entre las cuatro concentraciones ensayadas. En lo que respecta a la resistencia al pH, los resultados muestran que, para los pH ácidos ensayados, existe una inhibición del crecimiento de la cepa CECT 7210 para un pH más bajo de 3,0. Estos datos sirven como un indicador de la sensibilidad de la cepa CECT 7210 a pH ácidos en ensayos *in vivo*
- 15 durante largos periodos de tiempo (24 h). Sin embargo, es necesario considerar que las condiciones *in vivo* son otras. Por un lado, el tiempo transitorio del probiótico en el estómago, donde se alcanzaban estos pH, no supera normalmente las dos horas y pasa rápidamente al intestino delgado donde se neutraliza el pH permitiendo el crecimiento bacteriano. Por otro lado, *in vivo*, el probiótico se ingiere junto con otros compuestos (vehículo) que pueden amortiguar el efecto inhibitor del pH del estómago. En lo que se refiere a la resistencia a NaCl, el resultado
- 20 mostró que para concentraciones entre 0 y 2 % no se apreciaba una inhibición del crecimiento. Sin embargo, una vez que la concentración era de hasta el 3-6 %, se observaba una pequeña inhibición del crecimiento pero era con NaCl al 8-10 % cuando el crecimiento se inhibía aparentemente.

3.4. Adhesión de la cepa CECT 7210 a la mucosa intestinal

- 25 **[0060]** Se utilizó mucina de cerdo de tipo III a una concentración de 0,5 mg/ml. La cepa CECT 7210 se marcó con radioactividad añadiendo al medio de cultivo 10 µl/ml de timidina tritiada ($5\text{-}^3\text{H}$ -timidina 120 Ci/mmol; Amersham Biosciences) y se incubó a 37 °C durante 17 h en condiciones anaerobias. Como controles en el estudio de adhesión se utilizaron tres cepas comerciales de *Lactobacillus casei* (LC), *Lactobacillus rhamnosus* (LR) y *Bifidobacterium*
- 30 *longum* biovariedad *infantis* (BLI). La mucosa se disolvió en tampón HEPES (ácido (N-2-hidroxietil piperazin-N-2-etanosulfónico) - Hanks (HH; HEPES 10 mM, pH 7,4) a la concentración deseada y se inmovilizó en placas multipocillo de poliestireno (Maxisorp, Nunc) añadiendo 100 µl de esta solución a cada uno de los pocillos e incubando a 4 °C durante una noche. La mucosa no inmovilizada se retiró mediante dos lavados sucesivos con 200 µl de tampón HH. Después del último lavado, a cada pocillo se añadieron 100 µl de tampón HH. Las bacterias
- 35 marcadas con radioactividad se centrifugaron (6000 rpm durante 7 minutos) y se lavaron dos veces con tampón HH para eliminar la timidina no metabolizada, después de lo cual la concentración de las bacterias se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm ajustando a una DO de $0,25 \pm 0,05$ con el fin de normalizar el número de bacterias a 10^7 - 10^8 ufc/ml. A cada uno de los pocillos donde estaba inmovilizada la mucosidad se añadieron 100 µl de células marcadas y se incubó durante 1 h a 37 °C. La eliminación de las bacterias no adherentes se realizó
- 40 mediante dos lavados de 200 µl con tampón HH. Las bacterias adheridas se liberaron mediante un raspado de la mucosidad inmovilizada en cada pocillo y se sometieron a lisis más tarde con 1 % (p/v) de SDS en NaOH 0,1 M (200

μl por pocillo) incubando las placas a 60 °C durante 1 h. El contenido de las células se transfirió a tubos eppendorf que contenían líquido de centelleo para medir la radioactividad en un contador de centelleo. La adhesión se expresó como porcentaje de radioactividad recuperada después de la adhesión en relación con la radioactividad de la suspensión bacteriana añadida a la mucosidad inmovilizada. La adhesión bacteriana se determinó en tres experimentos independientes y cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

[0061] La cepa CECT 7210 mostró una buena capacidad de adhesión del 9,9 % similar a la de las cepas control (BLI 6,4 %, LC 7,0 % y LR 9,8 %).

4. Actividad *in vitro* contra rotavirus

4.1. Efecto competitivo de la cepa CECT 7210 frente a sitios de unión celular contra rotavirus Wa humano

[0062] La cepa CECT 7210 se cultivó durante 17 h a 37 °C en condiciones anaerobias. Los cultivos se lavaron con solución salina (0,09 %) a un inóculo de 3×10^6 ufc/ml. Simultáneamente, se indujo la formación de una monocapa de células HT-29 y MA-104 en placas de 96 pocillos. Los ensayos se realizaron siguiendo dos estrategias A y B.

[0063] Estrategia A – primero incubación de la cepa CECT 7210 con el rotavirus y después infección de los cultivos celulares con la mezcla de suspensión bacteriana-virus. Estrategia B – primero incubación de cepa CECT 7210 con los cultivos celulares y después infección con rotavirus.

[0064] Estrategia A: 30 μl de la suspensión bacteriana de la cepa CECT 7210 que contenía 3×10^6 se mezclaron con 70 μl de medio D-MEM sin suero. A esta suspensión se añadieron 100 μl de rotavirus Wa humano a una concentración de 1×10^7 ufc/ml ("uff" es unidades formadoras de focos), a la dilución adecuada, en medio D-MEM. Las mezclas de suspensión bacteriana-virus se incubaron a 37 °C durante 1 h. Las monocapas de células se lavaron 3 veces con tampón PBS y se inocularon con la mezcla de suspensión bacteriana-virus durante 18 h a 37 °C con 5 % de CO₂. Las células infectadas con rotavirus se identificaron mediante la técnica de inmunoperoxidasa para evaluar la capacidad inhibidora de la replicación viral.

[0065] Estrategia B: 30 μl de la suspensión bacteriana de la cepa CECT 7210 que contenía 3×10^6 se mezclaron con 70 μl de medio D-MEM sin suero. El medio de mantenimiento de las monocapas celulares se eliminó lavándolas 3 veces con tampón PBS y se añadieron 100 μl/pocillo de la suspensión bacteriana. Después de una hora de incubación a 37 °C, se añadieron 100 μl/pocillo de virus (1×10^7 ufc/ml) en medio D-MEM. Después, se incubó durante 18 h a 37 °C con 5 % de CO₂ y las células infectadas con rotavirus se identificaron también usando la técnica de inmunoperoxidasa (véase a continuación).

[0066] Para detectar el antígeno viral con inmunoperoxidasa en cultivos de células HT-29 y MA-104, después de infectar los cultivos celulares con el virus, éstos se lavaron dos veces con tampón PBS, se fijaron con metanol-acetona (1:1) durante 15 minutos y se lavaron de nuevo con tampón PBS. Se añadió el anticuerpo monoclonal anti-VP6 2F3E7 diluido 1/200 en tampón PBS que contenía BSA al 1 % (100 μl/pocillo) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Después de dos lavados con tampón PBS, se añadieron 100 μl/pocillo de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido a 1/2000 en tampón PBS-BSA al 1 %, y se incubó a 37 °C durante 1 h. Después de tres lavados con tampón PBS, se añadieron 100 μl/pocillo de sustrato de diamin-bencidina (6 mg DAB, 9 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,6 y 0,1 ml de H₂O₂). Los focos infecciosos teñidos con peroxidasa se contaron con un microscopio invertido. El recuento del número de focos infecciosos se realizó en 5 campos definidos por pocillo. La media aritmética se calculó para determinar el número de focos por campo microscópico y se comparó con los datos de un control de virus sin tratamiento con la cepa CECT 7210 para obtener el porcentaje de reducción de focos infecciosos.

[0067] Se usaron cultivos de células HT-29 y MA-104 y se añadió un inóculo de bacterias de la cepa CECT 7210 de 3×10^6 ufc/ml, en tampón PBS a una alta dosis de rotavirus Wa humano. Estos ensayos se realizaron siguiendo las dos estrategias explicadas anteriormente. Los resultados obtenidos en ambos ensayos fueron similares. Considerando los medios de ambos ensayos, la cepa CECT 7210 produjo una reducción de focos infecciosos de un 39,17 % en células HT29 y de un 25 % en células MA104. Sin embargo, se detectó un aumento ligero de inhibición en el ensayo B indicando que la interacción del probiótico con la superficie de las células de mamífero desempeña una función importante en el mecanismo de inhibición.

4.2.1. Producción de sobrenadante que contiene la sustancia de interés

[0068] Se realizó una fermentación de 10 litros con la cepa CECT 7210 en medio MRS complementado con cisteína (0,005 % p/v) para obtener un sobrenadante. La incubación se realizó a 37 °C durante 17 horas sin agitación y con generación de anaerobiosis, alcanzándose un valor final de densidad óptica a 600 nm de 5 unidades. La cantidad de inóculo utilizada fue el 1 % del volumen de fermentación. El sobrenadante se sometió en primer lugar a un proceso de neutralización basado en una centrifugación a 10000 rpm durante 15 min y una neutralización con NaOH 10 N hasta alcanzar un pH de 6,5. Después de esto, se realizó un proceso de concentración mediante una

filtración con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro, seguido de congelación a -80 °C y finalmente liofilización. Este último proceso permitió obtener una muestra enriquecida de la sustancia con la cual hacer los ensayos posteriores.

4.2.2. Análisis de la capacidad del sobrenadante para inhibir la proliferación de rotavirus SA-11 en la línea celular MA-104

[0069] Al igual que en los estudios previos usando células intactas, este ensayo se realizó siguiendo dos estrategias:

Estrategia A – infección de células MA-104 con rotavirus SA-11, previamente incubadas con el sobrenadante obtenido en la sección anterior.

Estrategia B – incubación de las células con el sobrenadante y posterior infección con rotavirus SA-11.

[0070] El protocolo seguido para la infección comenzó con la formación de una monocapa de células mediante la siembra de células MA-104 en medio MEM en placas de 96 pocillos ($1,5 \times 10^5$ células/ml). Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmósfera con 5 % (v/v) de CO₂. Al mismo tiempo se realizó la activación del rotavirus (inóculo de 2×10^8 uff) por medio de la incubación con tripsina de tipo IX a 10 µg/ml durante 30 min a 37 °C.

[0071] Estrategia A: una dilución adecuada del virus se mezcló con las diferentes alícuotas de sobrenadante y se incubó a 37 °C durante 1 h. La mezcla virus/sobrenadante se inoculó (100 µl/pocillo) en las monocapas de células MA-104 y se incubó a 37 °C durante 1 h con 5 % (v/v) de CO₂. Después del periodo de adsorción, se retiraron los inóculos de virus y las células se lavaron con tampón PBS. Se añadió medio MEM (100 µl/pocillo) sin suero a las células y finalmente se incubó durante 15-18 h a 37 °C con 5 % (v/v) de CO₂. Después de la incubación, los cultivos celulares infectados se ensayaron con el análisis de detección de focos con inmunoperoxidasa evaluando la capacidad inhibidora de replicación viral mediante el cálculo de reducción de focos infecciosos.

[0072] Estrategia B: se mezclaron alícuotas de sobrenadante con células MA-104 y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después, el sobrenadante se extrajo de los pocillos y las células se infectaron con una dilución adecuada de rotavirus SA-11, previamente activado. Esto se incubó a 37 °C durante 1 h con 5 % (v/v) de CO₂. Después del periodo de adsorción, se retiraron los inóculos de virus y las células se lavaron con tampón PBS. Se añadió medio MEM sin suero a las células (100 µl/pocillo) y finalmente se incubó durante 15-18 h a 37 °C con 5 % (v/v) de CO₂. Después de la incubación, los cultivos celulares infectados se ensayaron con el análisis de detección de focos con inmunoperoxidasa evaluando la capacidad inhibidora de replicación viral mediante el cálculo de reducción de focos infecciosos.

[0073] En la estrategia A, la cepa CECT 7210 produjo una reducción de focos infecciosos de un 51,6 % ($1,0 \times 10^7$ uff/ml de virus). En la estrategia B, el porcentaje de reducción fue del 83 % ($2,53 \times 10^6$ uff/ml de virus). Al igual que en el estudio anterior usando las células microbianas intactas, también en este caso la interacción preliminar entre el sobrenadante microbiano y las células de mamífero era más eficaz. Estos hechos sugieren contundentemente que las interacciones entre la superficie de la célula eucariota y el sobrenadante son factores importantes para la inhibición de la replicación del virus.

[0074] Como conclusión, estos dos estudios muestran que el sobrenadante de la cepa CECT 7210 produce inhibición de la infección por rotavirus, siendo mayor la inhibición cuando las alícuotas del sobrenadante se incuban previamente con células MA-104.

5.1. Caracterización de la sustancia de interés. Procesamiento del sobrenadante con proteasas

[0075] Para verificar la posible naturaleza proteica de la sustancia de interés, las muestras liofilizadas de 25 ml de sobrenadante se trataron con las proteasas proteinasa K y pepsina. La muestra liofilizada tratada con pepsina se resuspendió en 1,25 ml de tampón Mcllvaine 50 mM pH 4,0, al cual se añadieron 0,109 mm de una solución con pepsina (50 mg/ml). Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 2 h, y para detener la reacción, la pepsina se inactivó llevando la solución a un pH de 6,5 con la adición de 1,14 ml de tampón fosfato sódico 50 mM pH 8. La muestra liofilizada tratada con proteinasa K se resuspendió en 2,4 ml del tampón fosfato 50 mM pH 6,5, al cual se añadieron 0,1 ml de una solución de proteinasa K (50 mg/ml). Esta mezcla se incubó 37 °C durante 2 h y para detener la reacción, la proteinasa K se inactivó incubando la solución a 100 °C durante 15 minutos.

[0076] El análisis de la inhibición de la proliferación de rotavirus SA-11 para las alícuotas procesadas por proteasas, se realizó como se explica en la sección anterior, siguiendo las dos estrategias. Los resultados se muestran en las TABLAS 3 y 4.

TABLA 3. Muestras de virus y alícuotas incubadas durante 1 h a 37 °C con la Estrategia A.

Muestra	uff/ml virus	% de infección
Pepsina	2,9x10 ⁷	134,6
Proteinasa K	2,5x10 ⁷	117,9
Control negativo QC3	2,6x10 ⁷	121,7
Control positivo de ensayo	2,1x10 ⁷	100,0
Sobrenadante con cepa CECT 7210	1,0x10⁷	48,4
Control negativo C1	2,1x10 ⁷	100,0

TABLA 4. Muestras de células y alícuotas incubadas durante 1 h a 37 °C con la Estrategia B

Muestra	uff/ml virus	% de infección
Pepsina	1,76x10 ⁷	117,9
Proteinasa K	1,52x10 ⁷	101,8
Control negativo QC3	1,44x10 ⁷	96,4
Control positivo de ensayo	1,49x10 ⁷	100,0
Sobrenadante con cepa CECT 7210	2,53x10⁶	17,0
Control negativo C1	1,49x10 ⁷	100,0

- 5 **[0077]** El volumen de todas las muestras en las TABLAS 3 y 4 fue de 2,5 ml obtenido concentrando diez veces la solución con respecto al volumen de sobrenadante inicial. Como muestra de inhibición ensayada se utilizó una muestra liofilizada (sobrenadante de la cepa CECT 7210) no tratada con proteasas. En este caso, la muestra liofilizada de 25 ml se resuspendió en 2,5 ml de tampón de fosfato sódico 50 mM pH 6,5.
- 10 **[0078]** Como control de inhibición negativo, se usó una muestra liofilizada no fermentada. En este caso, la muestra liofilizada de 25 ml de medio de cultivo se resuspendió en 2,5 ml de tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,5. Los controles negativos incluidos en ambos ensayos eran con sobrenadante de medio de cultivo MRS-S sin inoculación (C1) y con este mismo sobrenadante pero incubado como el resto de las muestras durante 2 h a 37 °C (QC3).
- 15 **[0079]** Como control de infección positivo, se usó una solución compuesta por células y virus.

[0080] Como se muestra en las TABLAS 3 y 4, el tratamiento con diferentes proteasas dio lugar a la pérdida de la capacidad de inhibición, conforme con la proteína natural de la sustancia/sustancias responsables de la inhibición de la infección por rotavirus. Estos resultados se confirmaron mediante tratamientos similares con lipasas que no produjeron una reducción de la capacidad de inhibición.

5.2. Purificación e identificación de la sustancia/sustancias de interés por intercambio iónico, cromatografía seguida de cromatografía en fase inversa.

- 25 **[0081]** Se aplicaron 620 ml del sobrenadante de la cepa CECT 7210 a una columna de intercambio catiónico (HiPrep 16/10 SP FF). Todas estas proteínas de naturaleza catiónica que se adsorbieron a la resina de la columna se eluyeron con tampón equilibrado con NaCl 1 M sin gradiente. Por lo tanto, todas las proteínas se eluyeron simultáneamente en pocas fracciones (fracciones 2, 3 y 4) y en un volumen mínimo, de tal manera que la sustancia de interés se concentró. El volumen de cada fracción recogida fue de 10 ml. Cada fracción recogida por intercambio
- 30 catiónico se sometió a un proceso de ultrafiltración usando filtros de 5000 Da (Amicon Ultra, Millipore). Por tanto, el volumen filtrado contenía aquellas proteínas con un peso molecular menor de 5000 Da y el volumen retenido mantenía a aquellas proteínas con un peso molecular superior.

- [0082]** Los volúmenes filtrados obtenidos con las fracciones 2, 3 y 4 del intercambio catiónico se sometieron a otra
- 35 etapa de cromatografía de fase inversa para purificar y después identificar por espectrometría de masas, la sustancia/sustancias que proporcionan la inhibición de la infección por rotavirus. Para la cromatografía de fase inversa, se utilizó una columna RESOURCE RPC de 3 ml, que funcionaba en gradiente con los eluyentes A) 2-propanol al 5 %, ácido trifluoroacético (ATF) al 0,1 % en agua destilada y B) ATF al 0,1 % en 2-propanol. En esta cromatografía se obtuvieron fracciones de 2 ml. Una alícuota de estos 2 ml se llevó hasta la sequedad para eliminar
- 40 el disolvente y se resuspendió en un volumen de tampón MEM justo antes de comenzar el ensayo de inhibición de rotavirus con los cultivos celulares.

- [0083]** Las fracciones seleccionadas para ensayar la capacidad inhibidora de la infección por rotavirus de la fracción 2 de intercambio catiónico eran fracciones de fase inversa 2/5, 2/6, 2/7, 2/8, 2/9, 2/13, 2/14, 2/18, 2/20 y
- 45 2/23. De la fracción 3 de intercambio catiónico, se seleccionaron las siguientes fracciones de fase inversa: 3/7, 3/8, 3/9, 3/10, 3/11, 3/12, 3/13, 3/16, 3/17, 3/19, 3/20 y 3/21 y de la fracción 4 de intercambio catiónico, se seleccionaron

las fracciones de fase inversa 4/5, 4/6, 4/7, 4/8, 4/11 y 4/27.

TABLA 5. Inhibición de infección por rotavirus por fracciones de fase inversa obtenida de la fracción 2 de intercambio catiónico (incubación previa de células con alícuotas durante 1 h a 37 °C (Estrategia B))

Muestra	uff/ml virus	% de infección
2/5	1,65x10 ⁷	199,6
2/6	9,00x10 ⁶	108,9
2/7	9,30x10 ⁶	112,5
2/8	9,10x10 ⁶	110,1
2/9	8,40x10 ⁶	101,6
2/13	4,50x10⁶	54,4
2/14	1,21x10 ⁷	146,4
2/18	8,60x10 ⁶	104,0
2/20	1,24x10 ⁷	150,0
2/23	8,40x10 ⁶	101,6
Control	8,27x10 ⁶	100,0

5

TABLA 6. Inhibición de infección por rotavirus por fracciones de fase inversa obtenida de la fracción 3 de intercambio catiónico (incubación previa de células con alícuotas durante 1 h a 37 °C (Estrategia B))

Muestra	uff/ml virus	% de infección
3/7	2,07x10 ⁷	143,8
3/8	1,84x10 ⁷	127,8
3/9	8,20x10⁶	56,9
3/10	3,40x10⁶	23,6
3/11	1,64x10 ⁷	113,9
3/12	1,80x10 ⁷	125,0
3/13	2,21x10 ⁷	153,5
3/16	2,18x10 ⁷	151,4
3/17	2,04x10 ⁷	141,7
3/19	1,68x10 ⁷	116,7
3/20	1,65x10 ⁷	114,6
3/21	1,79x10 ⁷	124,3
Control	1,44x10 ⁶	100,0

TABLA 7. Inhibición de infección por rotavirus por fracciones de fase inversa obtenida de la fracción 4 de intercambio catiónico (incubación previa de células con alícuotas durante 1 h a 37 °C (Estrategia B))

10

Muestra	uff/ml virus	% de infección
4/5	9,40x10⁶	72,9
4/6	1,48x10 ⁷	114,7
4/7	1,41x10 ⁷	109,6
4/8	3,40x10⁶	23,6
4/11	3,60x10⁶	27,9
4/27	9,10x10⁶	70,5
Control	1,29x10 ⁷	100,0

[0084] Las fracciones que produjeron un resultado de inhibición positivo se analizaron por MALDI para determinar los pesos moleculares del péptido/péptidos presentes en cada fracción. Analizando todos los espectros, la única señal presente en todas las fracciones seleccionadas correspondían a un péptido con un peso molecular de 1282,63 Da. Por tanto, una de las fracciones se determinó por secuenciación, y el resultado fue un péptido de 11 aminoácidos cuya secuencia fue MHQPHQPLPPT y cuya masa molecular fue 1282,63 Da. Esta secuencia se confrontó con la base de datos de proteínas/péptidos mediante el algoritmo BLAST y se observó que esta secuencia era parte de la β -caseína de la leche de vaca. El análisis de todos los resultados experimentales condujo a pensar que la cepa CECT 7210 no producía este péptido. En lugar de esto, el péptido debe ser el resultado de la digestión

15

de la β -caseína de la leche de vaca mediante una proteasa segregada por la cepa CECT 7210. En la mayoría de las fracciones también estaba presente un péptido de 13 aminoácidos y de un peso molecular de 1513 Da.

6. Protección *in vivo* contra rotavirus

5

6.1. Estudios de la capacidad de colonización del tracto intestinal de ratón y su implicación en la protección *in vivo* contra infecciones con rotavirus

[0085] Cultivos de bacterias de la cepa CECT 7210 crecieron durante 24 h a 37 °C en condiciones anaerobias. A partir de estos cultivos, se realizaron inóculos al 1 % (p/v) en 25 ml de medio MRS-C. Después de 17 h de incubación en idénticas condiciones, se lavaron dos veces en solución salina al 0,09 % para un inóculo de 1×10^9 ufc/ml.

[0086] Las bacterias se resuspendieron en tampón de bicarbonato sódico y se congelaron a -70 °C en glicerol al 20 % hasta su uso.

[0087] Se ensayaron dos grupos de nueve ratones BALB/c de 8 semanas de vida. El grupo 1 fue el grupo control y el grupo 2 se trató con la cepa CECT 7210. El grupo control se trató en cada dosis con 100 μ l/ratón de bicarbonato sódico. El segundo grupo se trató en cada dosis con 10^9 ufc/ratón de la cepa CECT 7210 resuspendida en 100 μ l de bicarbonato sódico también. Todos los ensayos se realizaron a diferentes tiempos en cada uno de los grupos. El esquema de inoculación fue el siguiente:

TABLA 8. (¹ horas desde la inoculación de la 1ª dosis de la cepa CECT 7210)

Día	Dosis de la cepa CECT 7210	Recogida de heces
1	1ª dosis	4 horas ¹ y 10 horas
2	2ª dosis	24 horas ¹
3	3ª dosis	48 horas ¹
4	--	--
5	-	96 horas ¹
6	--	--
7	--	--
8	--	168 horas ¹

[0088] Antes de la administración a los ratones, se eliminó el glicerol de las muestras bacterianas por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min, y se resuspendieron de nuevo en tampón de bicarbonato sódico. Después, a cada ratón, se administraron 100 μ l de la suspensión a una concentración de 10^9 ufc/ml, con un catéter a través del tracto gástrico. A los ratones del grupo control se les administraron 100 μ l de tampón de bicarbonato sódico. Se recogieron muestras de heces a diferentes horas desde la primera inoculación de la cepa CECT 7210 (véase la TABLA 8) y se homogeneizaron en tampón PBS (10 % p/v). Después, se agitaron enérgicamente, se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min, y se conservaron en refrigeración para procesar en menos de 24 horas. El sobrenadante se congeló a -30 °C hasta su uso en los estudios de estimulación del sistema inmunitario.

[0089] El análisis de la viabilidad de la cepa CECT 7210 en el tracto gastrointestinal se realizó mediante la siembra de muestras de heces en medio selectivo. El medio utilizado fue una placa de medio selectivo para *Bifidobacterium* (BFM). Antes de la siembra, se realizaron diluciones en serie y diversas de estas diluciones se sembraron en placas por duplicado. Los resultados mostraron que la cepa CECT 7210 alcanzaba su viabilidad máxima a las 10 h desde el inóculo, con valores en este punto entre 0,3 y 1×10^9 ufc/ml muy próximos al 100 % de viabilidad. Este tiempo se consideró como el adecuado para observar efectos posibles de la actividad probiótica y por lo tanto se utilizó para la infección con rotavirus en ensayos posteriores.

[0090] La determinación de anticuerpos de clase IgA en las muestras fecales se realizó por ELISA. Se trataron placas de poliestireno (Costar) con 100 μ l de dilución 1/250 de suero de oveja anti-IgA de ratón (Sigma) en tampón de carbonato/bicarbonato pH 9,6, incubándolas durante 2,5 horas a 37 °C y durante una noche a 4 °C hasta su uso. Después, el sobrenadante se eliminó y se lavó tres veces con 200 μ l de tampón PBS que contenía 0,1 % de Tween 20 (v/v) (PBS-T). A cada pocillo, se añadieron 100 μ l de los sobrenadantes de las muestras diluidos a 1/1000 en tampón PBS-T que contenía 1 % de BSA. Para detectar los anticuerpos, se usaron los anticuerpos anti-IgA de ratón marcados con peroxidasa a una dilución de 1/2000 en tampón PBS-T con BSA al 1 %. Finalmente, se añadieron 100 μ l/pocillo de sustrato OPD (ortofenilendiamina) y H₂O₂ y después de 5 o 10 min de incubación a temperatura ambiente la reacción se detuvo con 50 μ l de solución H₂SO₄ 3 M. La lectura de la absorbancia se determinó con un espectrofotómetro a 492 nm. Para la determinación de las concentraciones de IgA, se preparó una curva patrón con diluciones en serie de una solución de IgA de ratón de concentración bien conocida.

[0091] La cepa CECT 7210 produjo un aumento de la concentración de IgA en las heces. A tiempos más prolongados a partir de la primera dosis (96 h), los animales tratados con la cepa CECT 7210 alcanzaron una concentración de IgA de 30 mg/g en comparación con un valor de 18 mg/g en el grupo control de animales no tratados.

6.2. Estudio de la capacidad de protección de la cepa CECT 7210 en frente de la infección con rotavirus murino de la cepa McN

- [0092]** Se utilizaron los mismos grupos de ratones del estudio anterior. Después de la primera semana, se administró una nueva dosis de la cepa CECT 7210 a cada ratón. Esta dosis se repitió durante 4 días más. Además, un solo inóculo oral de rotavirus murino de la cepa McN contenía 100 dosis productoras de diarrea en el 50% (DD₅₀) en 50 µl de solución salina equilibrada de Earle (EBSS). Este inóculo se realizó 10 horas después de la primera dosis de memoria de la cepa CECT 7210. Se tomaron muestras fecales durante los nueve días siguientes para evaluar la presencia de la cepa CECT 7210 por recuento de células viables y la eliminación de virus en heces por ELISA.

TABLA 9. (¹horas desde la inoculación de la 1ª dosis de la cepa CECT 7210; ²inoculación de rotavirus 10 horas después de la 1ª dosis de memoria de la cepa CECT 7210; ³horas desde la inoculación de rotavirus)

Día	Dosis de la cepa CECT 7210 e infección por rotavirus	Recogida de heces	
1	1ª inoculación de la dosis de memoria de rotavirus ²	10 horas ¹	
2	2ª dosis	24 horas ³	34 horas ¹
3	3ª dosis	48 horas ³	54 horas ¹
4	4ª dosis	72 horas ³	
5	5ª dosis	96 horas ³	106 horas ¹
6	--	120 horas ³	
7	--	144 horas ³	
8	--	168 horas ³	
9	--	192 horas ³	

20

- [0093]** Para el recuento microbiano después de la infección, las muestras se tomaron después de 10, 34, 58, 106 y 168 horas de la primera dosis de la cepa CECT 7210. Las heces se resuspendieron en tampón EBSS al 10 %, se homogeneizaron con un hisopo, se agitaron enérgicamente y se centrifugaron (4000 rpm 5 min). Se recogió el sedimento con la cepa CECT 7210 y se almacenó en refrigeración para procesarse en menos de 24 horas. El sobrenadante se congeló a -30 °C hasta su uso posterior en los estudios de cuantificación del antígeno viral. Como en la sección anterior, el análisis de viabilidad de la cepa CECT 7210 se realizó usando placas de medio selectivo. Se realizaron diluciones en serie y diversas de estas diluciones se sembraron en placas por duplicado:

- [0094]** Para evaluar la eliminación del virus en las heces, el protocolo ELISA comenzó con el tratamiento de la placa de 96 pocillos de poliestireno con 100 µl de una dilución de 1/500 de un suero de oveja anti-rotavirus (Chemicon) en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6, incubándola durante 2,5 h a 37 °C y durante una noche a 4 °C. Después de tres lavados con tampón PBS-T, se añadieron 100 µl de sobrenadante de muestras de heces, se trataron como se describe en la sección anterior, a una dilución de 1/2 en tampón PBS-T con BSA al 1 % (p/v). Después de 1,5 h de incubación a 37 °C, el sobrenadante se eliminó y se lavó cuatro veces con tampón PBS-T para añadir 100 µl/pocillo del anticuerpo monoclonal anti-VP6 2F3E7. Esto se incubó de nuevo durante 1,5 h a 37 °C y después se realizaron cuatro lavados, 100 µl/pocillo de una dilución 1/2000 de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa en tampón PBS-T-BSA. Después de 1 h de incubación, esto se lavó cuatro veces con PBS-T y se añadió la solución de OPD y H₂O₂. La reacción se detuvo después de 5-10 min con 50 µl de solución H₂SO₄ 3M. La lectura de la absorbancia se determinó a 492 nm. Para cuantificar la concentración del virus, se analizaron diluciones en serie de una suspensión de virus valorada, con el propósito de hacer una curva patrón y extrapolar los resultados de absorbancia. Los resultados obtenidos mostraron que el recuento de células viables estaba en su máximo de viabilidad durante los cinco días durante los que se proporcionó la cepa CECT 7210 y que este máximo se estableció 10 horas después de cada dosis de cepa CECT 7210.

45

[0095] Para cuantificar la cantidad de antígeno viral en las heces, se tomaron muestras durante los nueve días siguientes de la inoculación de los rotavirus murinos McN de acuerdo con el calendario. La detección del antígeno se realizó por ELISA. Como control positivo, el grupo control se inoculó con la misma cantidad de rotavirus.

- [0096]** Respecto a la evolución de la infección viral, los resultados indicaron la existencia de un retraso en la proliferación de rotavirus las primeras 48 h después de la infección (10⁶ uff/ml en comparación con 4x10⁷ uff/ml en

los animales del grupo control no tratados). Este retraso puede deberse a una reducción inicial en los niveles de replicación del rotavirus en los ratones tratados con la cepa CECT 7210, aunque finalmente el virus infectó a todos los grupos de ratones a los que se proporcionó la sobredosis viral inoculada. Estas diferencias son estadísticamente significativas.

5

7. Purificación e identificación de la proteasa CECT 7210 responsable de la degradación de la β -caseína y de la producción de 11-oligómeros

[0097] La cepa CECT 7210 se cultivó en MRS (Pronadisa, España) con cisteína (0,05 % p/v). Después de 17 horas a 37 °C, sin agitación en condiciones anaerobias el sobrenadante se obtuvo por centrifugación y el proceso de purificación comenzó con la precipitación de sulfato de amonio. Después la centrifugación de la muestra (30 min, 10000 rpm) el sedimento obtenido se resuspendió en Tris-HCl 20 mM pH 8,5 para la diálisis. 920 ml del sobrenadante con CECT 7210 obtenido siguiendo el proceso de la sección 4.2.1, se aplicaron a una columna de intercambio aniónico (HiPrep 16(10 Q XL) (Ge Healthcare, Amersham Biosciences, AB, Suecia). Todas estas proteínas de naturaleza aniónica que se adsorbieron a la resina de la columna se eluyeron con tampón equilibrado (Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, CaCl₂ 5 mM) con un gradiente de NaCl de 0-1 M. Por tanto, todas las proteínas se eluyeron simultáneamente en pocas fracciones y en un volumen mínimo, de tal manera que la sustancia de interés se concentró. Cada fracción recogida se sometió a un proceso de ultrafiltración usando filtros de 10000 Da (Extreme Amicon, Millipore). Por tanto, el volumen filtrado que contenía aquellas proteínas con un peso molecular mayor de 10000 Da se sometió a otra etapa de cromatografía de filtración en gel con una columna de calidad prep 75 HiLoad Superdex (Amersham Bioscience, GE Healthcare) para purificar, y después identificar por SDS/PAGE. La enzima que se verificó en cada etapa de purificación tuvo actividad proteasa.

[0098] La proteasa responsable de la degradación de la β -caseína se identificó en un SDS-PAGE al 12,5 %. Se observó un peso molecular de la proteasa de aproximadamente 34,8 y 80 kDa. La adición de 0,04 UI de actividad proteasa contenida en la última fracción de purificación cromatográfica para la β -caseína (2 %) como sustrato en un ensayo enzimático a 50 °C en tampón citrato-fosfato pH 6,4 durante 48 horas, produjo 0,0213 mg/ml de péptido de 11 meros.

30 LISTA DE SECUENCIAS

[0099]

35	<110> Laboratorios Ordesa, S.L.
	<120> Una nueva cepa de <i>Bifidobacterium</i> y péptidos activos contra infecciones por rotavirus
	<130> Ordesa P896PC00 probiotic
40	<150> EP07111189.2
	<151> 27-06-2007
	<160> 19
45	<170> PatentIn versión 3.5
	<210> 1
	<211> 11
	<212> PRT
50	<213> Artificial
	<220>
	<223> péptido del sobrenadante
55	<400> 1

Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr
1 5 10

60	<210> 2
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Artificial

ES 2 611 277 T3

<220>
 <223> péptido del sobrenadante

 <400> 2
 5

 Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val
 1 5 10

 <210> 3
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido del sobrenadante
 15
 <400> 3

 Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met
 1 5 10

 20 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> péptido del sobrenadante
 <400> 4

 Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe
 1 5 10
 30

 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido del sobrenadante
 40 <400> 5

 Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr
 1 5 10

 45 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> péptido del sobrenadante
 <400> 6

 Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val
 1 5 10
 55
 <210> 7

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> péptido del sobrenadante
 <400> 7
 Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met
 1 5 10
 10
 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> péptido del sobrenadante
 <400> 8
 Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe
 1 5 10 15
 20
 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> péptido del sobrenadante
 <400> 9
 Ser Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr
 1 5 10
 30
 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> péptido del sobrenadante
 <400> 10
 Ser Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val
 1 5 10
 40
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> péptido del sobrenadante
 <400> 11

ES 2 611 277 T3

		Ser	Trp	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Met	
		1				5					10					15	
5		<210> 12 <211> 16 <212> PRT <213> Artificial															
10		<220> <223> péptido del sobrenadante <400> 12															
		Ser	Trp	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Met	Phe
		1				5					10					15	
15		<210> 13 <211> 14 <212> PRT <213> Artificial															
20		<220> <223> péptido del sobrenadante <400> 13															
25		Gln	Ser	Trp	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr		
		1				5					10						
30		<210> 14 <211> 15 <212> PRT <213> Artificial															
35		<220> <223> péptido del sobrenadante <400> 14															
40		Gln	Ser	Trp	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	
		1				5					10					15	
45		<210> 15 <211> 16 <212> PRT <213> Artificial															
		<220> <223> péptido del sobrenadante <400> 15															
50		Gln	Ser	Trp	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Met
		1				5					10					15	
55		<210> 16 <211> 17 <212> PRT <213> Artificial															

<220>
 <223> péptido del sobrenadante

<400> 16

5

Gln Ser Trp Met His Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met
 1 5 10 15

Phe

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>

15

<223> cebador 616V para el gen ARNr 16S

<400> 17
 agagtttgat ymtggctcag 20

20

<210> 18
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> cebador 699R para el gen ARNr 16S

<400> 18
 rgggttgccg tcgtt 15

30

<210> 19
 <211> 1166
 <212> DD1A
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> secuencia de ARNr 16S

40

<220>
 <221> misc feature
 <222> (792)..(792)
 <223> n es a, c, g o t

45

<220>
 <221> misc feature
 <222> (864)..(864)
 <223> n es a, c, g o t

50

<220>
 <221> misc feature
 <222> (885)..(885)
 <223> n es a, c, g o t

55

<220>
 <221> misc feature
 <222> (950)..(950)
 <223> n es a, c, g o t

60

<220>
 <221> misc feature

ES 2 611 277 T3

<222> (961)..(961)
 <223> n es a, c, g o t

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (993)..(993)
 <223> n es a, c, g o t

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1006) .. (1006)
 <223> n es a, c, g o t

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1022)..(1022)
 <223> n es a, c, g o t

20 <400> 19

cgaactgaga	ccggttttca	gggatccgct	ccgcgtcgcc	gcgtcgcatc	ccgttgtacc	60
ggccattgta	gcatgcgtga	agccctggac	gtaaggggca	tgatgatctg	acgtcatccc	120
caccttcttc	cgagttaacc	cgggcgggtcc	cccgtgagtt	cccggcataa	tccgttgcca	180
acacggggcg	agggttgccg	tcgttgccgg	acttaaccca	acatctcacg	acacgagctg	240
acgacgacca	tgcaccacct	gtgaaccggc	cccgaaggga	agccgtatct	ctacgaccgt	300
cgggaacatg	tcaagcccag	gtaaggttct	tcgcgttgca	tgaattaat	ccgcattgct	360
cgcgccttgt	gcgggcccc	gtcaatttct	ttgagtttta	gccttgccgc	cgtactcccc	420
aggcgggatg	cttaacgcgt	tagctccgac	acggaaccgg	tggaacgggc	cccacatcca	480
gcacccaccg	tttacggcgt	ggactaccag	ggtatotaat	cctgttcgct	ccccacgctt	540
tcgctcctca	gcgtcagtaa	cggcccagag	acctgccttc	gccattgggtg	ttcttcccga	600
tatctacaca	ttccaccgtt	acaccgggaa	ttccagtctc	ccctaccgca	ctcaagcccg	660
cccgtacccg	gcgcggatcc	accgttaagc	gatggacttt	cacaccggac	gcgacgaacc	720
gcctacgagc	cctttacgcc	caataattcc	ggataacgct	tgcaccctac	gtattaccgc	780
ggctgctggc	angtagttag	ccggtgctta	ttcaacgggt	aaactcactc	tcgcttgctc	840
cccgataaaa	gaggtttaca	accngaaggc	ctccatccct	cacngggggt	cgtgcatca	900
ggcttgccgc	cattgtgcaa	tattccccac	tgctgcctcc	cgtaggagtn	tgggccgtat	960
ntcagtccca	atgtggccgg	tcgcctcttc	agnccggcta	ccgtnngaag	ccacggtggg	1020
cngttacccc	gcdgtcaagc	tgataggacg	cgaccccatc	ccataccgcg	aaagctttcc	1080
cagaagacca	tgcgatcaac	tggagcatcc	ggcattacca	cccgtttcca	ggagctatcc	1140
cggtgtatgg	ggcaggtcgg	tcacgc				1166

REIVINDICACIONES

1. Uso de un péptido que tiene una longitud de 11 a 17 aminoácidos y una secuencia aminoacídica que comprende SEQ ID NO: 1, en donde dicha secuencia aminoacídica se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-16, o
5 una sal farmacéuticamente aceptable del péptido para la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de la diarrea en un animal que incluye un humano, en donde la diarrea está causada por un rotavirus.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medicamento comprende además una bacteria que tiene la
10 capacidad de producir el péptido.
3. Uso de un péptido que tiene una longitud de 11 a 17 aminoácidos y una secuencia aminoacídica que comprende SEQ ID NO: 1, en donde dicha secuencia aminoacídica se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-16 o una sal farmacéuticamente aceptable del péptido, para la fabricación de un producto alimenticio.
15
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el producto alimenticio comprende además una bacteria que tiene la capacidad de producir el péptido.
5. Uso de un péptido que tiene una longitud de 11 a 17 aminoácidos y una secuencia aminoacídica que comprende
20 SEQ ID NO: 1, en donde dicha secuencia aminoacídica se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-16 o una sal farmacéuticamente aceptable del péptido, para la fabricación de una composición nutricional.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición nutricional comprende además una bacteria que tiene la capacidad de producir el péptido.
25
7. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1.
8. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 3.
- 30 9. Péptido que tiene una longitud de 11 a 17 aminoácidos y una secuencia aminoacídica que comprende SEQ ID NO: 1, en donde dicha secuencia aminoacídica se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-16 o una sal farmacéuticamente aceptable del péptido, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la diarrea en un animal que incluye un humano, en donde la diarrea está causada por un rotavirus.

35

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- | | | |
|----|---|---|
| 10 | <ul style="list-style-type: none"> • EP 1571213 A1 [0009] • JP 08259597 B [0010] • EP 1353681 A1 [0011] • WO 2003010297 A1 [0012] | <ul style="list-style-type: none"> • US 5922375 A [0014] • EP 1359157 A [0017] • WO 0230958 A [0018] • EP 08774380 A [0033] |
| 15 | <ul style="list-style-type: none"> • WO 0042168 A1 [0013] | <ul style="list-style-type: none"> • EP 2008058206 W [0033] |

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- | | | |
|----|---|---|
| 20 | <ul style="list-style-type: none"> • C.W. CHRISTAKIS et al. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: A meta-analysis. <i>Pediatrics</i>, 2002, vol. 109, 678-84 [0007] | <ul style="list-style-type: none"> • SUPERTI et al. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. <i>BIOCHIMICA ET BIOPHISICA ACTA</i>, 03 October 2001, vol. 1528 (2-3), 107-115 [0015] |
| 25 | <ul style="list-style-type: none"> • J.M. SAAVEDRA et al. Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. <i>Lancet</i>, 1994, vol. 344, 1046-9 [0007] | <ul style="list-style-type: none"> • Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1990 [0027] |
| 30 | <ul style="list-style-type: none"> • S. GUANDALINI et al. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European study. <i>J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.</i>, 2000, vol. 30, 54-60 [0008] | |