

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 529**

51 Int. Cl.:

C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2012 PCT/EP2012/065804**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO2013024066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2012 E 12745707 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2742141**

54 Título: **Microcina S. formada bacteriamente, un nuevo péptido antimicrobiano, eficaz contra microorganismos patógenicos, por ejemplo, Escherichia Coli enterohemorrágica (EHEC)**

30 Prioridad:

12.08.2011 EP 11177451

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

28.06.2017

73 Titular/es:

**SYMBIOGRUPPE GMBH & CO. KG (100.0%)
Auf den Lüppen 8
35745 Herborn, DE**

72 Inventor/es:

**GUNZER, FLORIAN;
ZSCHUETTIG, ANKE y
ZIMMERMANN, KURT**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 620 529 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

Microcina S. formada bacteriamente, un nuevo péptido antimicrobiano, eficaz contra microorganismos patogénicos, por ejemplo, *Escherichia Coli* enterohemorrágica (EHEC)

5 **Campo de la invención**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a un polipéptido aislado, moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido microcina S. La invención también se refiere a plásmidos y células que comprenden las moléculas de ácido nucleico, un anticuerpo que se une al polipéptido, las composiciones, así como procedimientos para producir y usar los polipéptidos. La presente invención se refiere además a usos médicos para el tratamiento o la prevención de infecciones microbianas, trastornos gastrointestinales funcionales o el tratamiento de un tumor. La invención se refiere además a un procedimiento para la conservación de alimentos y a un procedimiento para el recubrimiento de material de apósito.

15 **Antecedentes de la invención**

20 **[0002]** Las microcinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente con una masa molecular baja. Producidas por enterobacterias, principalmente *Escherichia coli*, la síntesis de microcinas está fuertemente activada bajo condiciones de estrés, tales como la limitación de nutrientes. Las microcinas ejercen una potente actividad antimicrobiana/antibacteriana frente a especies estrechamente relacionadas, lo que ofrece una ventaja altamente competitiva en la microflora intestinal (Baquero, F., Bouanchaud, D., Martínez-Pérez, MC & Fernández, C. (1978) J. Bacteriol 135, 342-347). Los productores de microcinas son resistentes a la microcina que producen, que está mediada por al menos un gen que confiere resistencia que se encuentra dentro de un grupo de genes. La mayor parte de las 14 microcinas conocidas son codificadas por plásmidos, pero se han descrito también péptidos antimicrobianos/antibacterianos codificados cromosómicamente. La cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917 (EcN) produce las microcinas M y H47 (Patzner, S.I., Baquero, M.R., Bravo, D., Moreno, F. & Hantke, K. (2003) Microbiology 149, 2557-2570). Los probióticos se definen como microorganismos vivos, que tras la ingestión en cierto número ejercen efectos positivos sobre la salud más allá de la nutrición básica inherente. Los mecanismos que permiten que una cepa sea probiótica son poco conocidos. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de las microcinas puede influir positivamente en el equilibrio intestinal. Suponiendo la ausencia de factores patógenos, así como una seguridad clínica bien demostrada, una cepa productora de microcinas puede cumplir claramente con la definición de un probiótico. A diferencia de las microcinas enterobacterianas, las bacterias del ácido láctico de origen alimentario producen antibióticos peptídicos que contienen lantionina. Los denominados lantibióticos de bacterias gram-positivas ya se utilizan para la conservación de alimentos (Kuipers, A., Rink, R. & Moll, G.N. (2011) Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications (Springer Science + Business Media, Berlín). El uso como agente antitumoral (Hetz, C., Bono, M.R., Barros, L.F. y Lagos, R. (2002) Proc Natl Acad Sci USA. 99, 2696-2701) o como una alternativa a los antibióticos clásicos en enfermedades infecciosas (Dicks, L.M.T., Heunis, T.D.J., van Staden, D.A., Brand, A., Sutyak Noll, K. & Chikindas, ML (2011) Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications (Springer Science + Business Media, Berlín), Gillor, O., Kirkup, B.C. & Riley, M.A. (2004) Adv. Appl Microbiol 54, 129-146) son dos aplicaciones de bacteriocinas descritas adicionalmente.

45 **[0003]** Desde hace décadas y en la actualidad, el tratamiento de infecciones bacterianas se basa principalmente en antibióticos clásicos. Sin embargo, la aparición de patógenos resistentes a estos antibióticos clásicos constituye un problema enorme. En consecuencia, las opciones de tratamiento restantes son aún más restringidas. Este efecto negativo se ve también en otras industrias de importancia económica, tal como, por ejemplo, la industria alimentaria.

50 **[0004]** Symbio Pharm: "Symbioflor", documento recuperado de Internet el 12 de noviembre de 2010, da a conocer cepas de *E. coli* utilizadas para la identificación de la agrupación de genes que codifican microcinas de la invención.

[0005] La base de datos EMBL, no. de acceso EE172646, da a conocer numerosos ejemplos de una secuencia de EST de *Zea mays* con cierta identidad de secuencia con SEQ ID No: 2.

55 **[0006]** NORMAN A. "Genetic Characterizations of IncX-plasmids of the Enterobacteriaceae", Tesis, 1 de enero de 2009, da a conocer una secuencia y la caracterización de plásmidos IncX.

[0007] GILLOR O. et al, Advances in Applied Microbiology, vol. 54, páginas 129-146 revisan el conocimiento de microcinas y sus usos.

60 **[0008]** La BASE DE DATOS EMBL, no. de acceso. FP102945, da a conocer una secuencia de un clon de ADN de pez cebra con cierta identidad de secuencia con SEQ ID No: 3.

[0009] ATTIA AHMED S. et al, BMC Microbiology, vol. 9, no. 1, página 207, describen la identificación de un grupo de genes de bacteriocinas en *Moraxella catarrhalis* con cierta identidad de secuencia con SEQ ID No: 4.

65 **[0010]** La BASE DE DATOS EMBL, no. de acceso U47048 describe la región 24 de microcinas de *E. coli*.

Descripción resumida de la invención

Problema técnico

[0011] La presente invención se realizó a la luz de la técnica anterior descrita anteriormente y en vista de la creciente demanda de nuevos agentes antibacterianos y profilácticos en medicina humana y veterinaria. La terapia de cepas de de beta-lactamasa de mayor espectro (ESBL) es cada vez más desafiante. El objetivo de la presente invención es la provisión de un nuevo polipéptido microcina antimicrobiano que pueda ser utilizado como una alternativa a los antibióticos convencionales y por lo tanto para el control de microorganismos patógenos que son productores de ESBL. En este sentido, un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo polipéptido microcina antimicrobiano que puede utilizarse en el tratamiento de bacterias gram negativas incluyendo *E. coli* productor de ESBL, y, además, también incluyendo la cepa de *E. coli* enterohemorrágica altamente virulenta (EHEC) que fue el patógeno causante de un brote importante muy reciente en Alemania (Frank, C., et al (2011) N Engl J Med 10.1056/NEJMoa1106483; Mellmann, A., et al (2011) PLoS ONE 6 (7): e22751. doi: 10.1371). Las células de EHEC liberan mayores cantidades de toxinas Shiga por tratamiento con ciertos antibióticos. Por lo tanto, se describe que el tratamiento con antibióticos de pacientes está contraindicado. El nuevo polipéptido microcina debe ser eficaz en el tratamiento y la prevención de infecciones por EHEC y *E. coli* enteropatógena (EPEC). Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un nuevo polipéptido microcina antimicrobiano que puede utilizarse en el tratamiento de trastornos gastrointestinales funcionales, en particular, el síndrome del intestino irritable, en adultos y niños. Un objetivo adicional de la invención es proporcionar composiciones que comprenden el nuevo polipéptido microcina de células que producen el nuevo polipéptido microcina para dichos usos médicos. Un objetivo de la presente invención es también proporcionar un nuevo polipéptido microcina que se puede utilizar en el tratamiento de cáncer, que puede utilizarse en la conservación de alimentos y que puede utilizarse en el recubrimiento de material de apósito.

Descripción de la invención

[0012] Para resolver el problema, la presente invención proporciona, en un aspecto, un polipéptido aislado con actividad antimicrobiana, en el que el polipéptido:

- a) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o de SEQ ID No: 7;
- b) está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70% o más idéntica a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma, en el que las SEQ ID Nos: 3, 4 y 5 se citan sólo para referencia;
- c) está codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma en condiciones rigurosas, en el que las SEQ ID Nos: 3, 4 y 5 se citan sólo para referencia. También se describe, pero se cita solo para referencia, un polipéptido que comprende una variante natural alélica de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o la SEQ ID No: 7.

[0013] En particular, se describe un polipéptido aislado con actividad antimicrobiana, en el que el polipéptido:

- a) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o la SEQ ID No: 7, comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos con actividad antimicrobiana;
- b) está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70% o más idéntica a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma, en el que las SEQ ID Nos: 3, 4 y 5 se citan sólo para referencia, comprendiendo la secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 1 que codifica un polipéptido con al menos actividad antimicrobiana; o comprendiendo la secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 2 que codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana. Se describe también, pero no se incluye en las presentes reivindicaciones, una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID No: 1 o 2 que codifica un polipéptido con actividad de auto-inmunidad para microcina S o actividad de transporte para microcina S, comprendiendo la secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 3 que codifica un polipéptido con actividad auto-inmunidad para microcina S, comprendiendo la secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 4 que codifica un polipéptido con actividad de transporte para microcina S, y comprendiendo la secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 5 que codifica un polipéptido con actividad de transporte para microcina S;
- c) está codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma en condiciones rigurosas, en el que las SEQ ID NOS: 3, 4 y 5 se citan sólo para referencia, comprendiendo la secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 1 que codifica un polipéptido con actividad al menos antimicrobiana y comprendiendo la secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 2 que codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana. Se describe también, pero no se incluye en las presentes reivindicaciones, la secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID No: 1 o 2 que codifica un polipéptido con actividad de auto-inmunidad para microcina S o actividad de transporte para microcina S, comprendiendo la

secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 3 que codifica un polipéptido con actividad auto-inmunidad para microcina S, comprendiendo la secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 4 que codifica un polipéptido con actividad de transporte para microcina S, y comprendiendo la secuencia de nucleótidos la SEQ ID No: 5 que codifica un polipéptido con actividad de transporte para microcina S.

5 d) También se describe, pero se cita solo para referencia, un polipéptido que comprende una variante natural alélica de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o la SEQ ID No: 7, comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos con actividad antimicrobiana.

10 **[0014]** El término "actividad antimicrobiana" ha de entenderse como una actividad antimicrobiana causada por microcina, específicamente por microcina S.

[0015] En un aspecto adicional de la invención, está disponible una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido microcina S, en el que dicha molécula de ácido nucleico:

15 a) comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 50% o más idéntica a una cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma, en el que las SEQ ID NOs: 3, 4 y 5 se citan sólo para referencia,

b) comprende una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 o 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma, en condiciones rigurosas, en el que las SEQ ID NOs: 3, 4 y 5 se citan solo para referencia;

20 c) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 6 o de la SEQ ID No: 7.

25 d) También se describe, pero se cita solo para referencia, un polipéptido que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una variante natural alélica de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o la SEQ ID No: 7.

[0016] Más específicamente, se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido microcina S, un polipéptido con actividad de auto-inmunidad para microcina S (citado sólo para referencia) o un polipéptido con actividad de transporte para microcina S (citado sólo para referencia), en el que dicha molécula de ácido nucleico:

30 a) comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70% o más idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma, en el que las SEQ ID NOs: 3, 4 y 5 se citan sólo para referencia, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 1 que codifica un polipéptido con al menos actividad antimicrobiana o actividad de auto-inmunidad para microcina S o actividad de transporte para microcina S, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 2 que codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 3 que codifica un polipéptido con actividad auto-inmunidad para microcina S, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 4 que codifica un polipéptido con actividad de transporte para microcina S, y comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 5 que codifica un polipéptido con actividad de transporte para microcina S;

35 b) comprende una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma, en condiciones rigurosas, en el que las SEQ ID NOs: 3, 4 y 5 se citan sólo para referencia, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 1 que codifica un polipéptido con al menos actividad antimicrobiana o actividad de auto-inmunidad para microcina S (citado sólo para referencia) o actividad de transporte para microcina S (citado sólo para referencia), comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 2 que codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 3 que codifica un polipéptido con actividad de auto-inmunidad para microcina S, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 4 que codifica un polipéptido con actividad de transporte para microcina S, y comprendiendo la molécula de ácido nucleico la SEQ ID No: 5 que codifica un polipéptido con actividad de transporte para microcina S;

40 c) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o de la SEQ ID No: 7, teniendo el polipéptido actividad antimicrobiana.

45 d) También se describe, pero se cita solo para referencia, un polipéptido que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una variante natural alélica de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o la SEQ ID No: 7, teniendo el polipéptido actividad antimicrobiana.

50 **[0017]** En varios aspectos, la invención se refiere a un plásmido que comprende la molécula de ácido nucleico según la invención y a una célula que comprende la molécula de ácido nucleico y/o el polipéptido y/o el plásmido según la invención.

55 **[0018]** La invención también se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido según la invención.

60 **[0019]** Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición que comprende

65 a) un polipéptido según la invención; y/o

b) una célula según la invención.

[0020] También se describen el polipéptido, la célula y la composición de la invención para su uso en terapia o prevención.

[0021] En un aspecto, el polipéptido, la célula y la composición de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas, preferiblemente la infección microbiana comprende infecciones con *E. coli* enteropatógena y/o *E. coli* enterohemorrágica (EPEC, EHEC) o preferiblemente la infección microbiana comprende el síndrome urémico hemolítico (SUH), preferiblemente el síndrome urémico hemolítico enteropático.

[0022] En otro aspecto, el polipéptido, la célula y la composición de la invención son para su uso en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, preferiblemente trastornos gastrointestinales funcionales.

[0023] En un aspecto adicional, el polipéptido, la célula y la composición de la invención son para su uso en el tratamiento de un tumor.

[0024] La invención presenta un procedimiento para producir el polipéptido de la invención, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

i) introducir en una célula la molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 2 y/o el plásmido, según la reivindicación 3, cada uno tal como se describe anteriormente ,
 ii) y cultivar la célula en condiciones que permiten la expresión del polipéptido a partir de dicha molécula de ácido nucleico o dicho plásmido, o sintetizar el polipéptido según la invención y también en la reivindicación 1 por medio de técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase en solución.

[0025] Los polipéptidos aislados según la invención pueden producirse por dicho procedimiento para producir el polipéptido.

[0026] En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento in vitro para la identificación de bacterias que son sensibles a microcina S, en el que el procedimiento comprende poner en contacto el polipéptido según la invención o el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico según la invención, tal como se especifica también en la reivindicación 2, o la composición según la invención, tal como se especifica también en la reivindicación 6, con una célula, en el que la reducción de la eficacia de adhesión de la célula a las células epiteliales intestinales es indicativa de la sensibilidad de la célula a microcina S.

[0027] La invención también se refiere a un procedimiento para conservar alimentos, comprendiendo el procedimiento:

añadir a los alimentos al menos un tipo de un agente antimicrobiano natural, en el que el agente es

a) el polipéptido según la invención;

y/o

b) la composición según la invención, tal como se especifica también en la reivindicación 6.

[0028] En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para recubrir material de apósito, en el que el material de apósito está recubierto con:

a) el polipéptido según la invención; y/o

b) la composición según la invención, tal como se especifica también en la reivindicación 6.

Efectos ventajosos de la invención

[0029] Es decir, los presentes inventores han identificado el polipéptido microcina S que es una nueva microcina, no descrita previamente, cuyo secuencia de nucleótidos y de aminoácidos es única. Los genes que son responsables para los efectos de la microcina S han sido identificados y sus efectos se han caracterizado funcionalmente. Los inventores han encontrado sorprendentemente que, a diferencia de la mayoría de los antibióticos de beta-lactama clásicos, la microcina S muestra un efecto inhibitorio de EHEC, incluyendo la cepa del brote O104:H4 productora de ESBL, así como un aislado de EHEC O128:H2 y O157:H7 (Figura 5). Por lo tanto, se ha encontrado que la microcina S es eficaz en el tratamiento de infección por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) más. Por lo tanto, la microcina S podría utilizarse como una alternativa a los antibióticos convencionales y por lo tanto para el control de microorganismos patógenos. Además, es posible su uso para la conservación de alimentos, y la presente invención se completó de esta manera. Se ha encontrado además que el grupo de genes de microcina S (MCC) (SEQ ID No: 1) de *E. coli* G3/10, codificada por el plásmido pSYM1 (Figura 1), consiste en los cuatro genes agrupados *mcsS* (SEQ ID No: 2), *mcsI* (SEQ ID No: 3), *mcsA* (SEQ ID No: 4) y *mcsB* (SEQ ID No: 5). Dado que *E. coli* G3/10 es un probiótico bien probado utilizado, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, la microcina S no necesariamente tiene que purificarse a partir de la cepa. MccS debería ser ventajosamente eficaz in vivo.

[0030] Las ventajas son que la microcina S no es tóxica, no puede inducir alergias, y es difícil que los microbios patógenos desarrollen resistencia en contra.

[0031] Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

5 **Breve descripción de los dibujos**

[0032]

La figura 1 es un mapa vectorial de megaplásmido pSYM1 que codifica el operón MccS.

10 La figura 2 es un dibujo esquemático de la secuencia de aminoácidos del gen *mcsS* que codifica el precursor de microcina S (panel superior). Un péptido líder probable está subrayado. Los asteriscos indican la Cys posiblemente implicada en la formación de un enlace disulfuro típico para las microcinas de clase II. El grupo de genes de microcina S MccS (panel inferior) en el megaplásmido pSYM1 consiste en los cuatro genes agrupados *mcsS*, *mcsI*, *mcsA* y *mvsB*.

15 La figura 3 representa la eficacia de la adhesión de EPEC E2348/69 en las células epiteliales intestinales humanas después de la preincubación con cepas de *E. coli* MDS42 y G4/9 (de tipo salvaje) y mutantes de complementación de plásmido adecuados. Significado del asterisco utilizado: * $p \leq 0,01$.

20 La figura 4 representa la eficacia de la adhesión de EPEC E2348/69 de tipo salvaje y mutantes complementados de plásmidos a células epiteliales intestinales humanas después de la preincubación con diferentes cepas que expresan y no expresan microcinas. Significado de los asteriscos utilizados: * $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$. pAZ8 [*mcsA*, *mcsB*, *mcsI*], pAZ13 [*mcsI*], pAZ14 [*mcsI*, truncado].

25 La figura 5 muestra la eficacia de la adhesión de las cepas EHEC 86-24 serotipo O157:H7 (A), EHEC O104:H4 aislado en Dresden (B) y EHEC O104:H4 (C) y O128:H2 (D) aislado en Frankfurt (Oder) en células epiteliales intestinales humanas después de la preincubación con EcN o *E. coli* G3/10. Significado del asterisco utilizado: * $p \leq 0,01$ en comparación con el control negativo.

La figura 6 ilustra los resultados de un cribado de *mcsS* usando PCR multiplex y el gen *recA* como control de inhibición.

Breve descripción de la lista de secuencias

30 [0033]

SEQ ID No: 1 es la secuencia de nucleótidos del operón de microcina S de *E. coli* G3/10.

SEQ ID No: 2 es la secuencia de nucleótidos del gen *mcsS* de *E. coli* G3/10.

SEQ ID No: 3 es la secuencia de nucleótidos del gen *mcsI* de *E. coli* G3/10.

SEQ ID No: 4 es la secuencia de nucleótidos del gen *mcsA* de *E. coli* G3/10.

35 SEQ ID No: 5 es la secuencia de nucleótidos del gen *mcsB* de *E. coli* G3/10.

SEQ ID No: 6 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor de microcina S de *E. coli* G3/10 que incluye una secuencia líder.

SEQ ID No: 7 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido microcina S de *E. coli* G3/10 sin el péptido líder.

40 SEQ ID NOS: 8 - 26 son cebadores de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes contenidos en el operón de microcina S (SEQ ID No: 1) o sondas para cribar el gen *mcsS* (SEQ ID No: 2) que codifica el polipéptido microcina S.

Descripción detallada de la invención

45 **Definiciones**

[0034] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por el experto en la materia a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, regirá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

50 [0035] Los artículos "un", "una" o "el/la" se refieren a "uno" o "varios" cada vez que se utiliza en el presente documento, es decir, significa "uno", "al menos uno" o "uno o más". Por ejemplo, el término "una célula" puede referirse a una sola célula, así como a una pluralidad de células.

55 [0036] El término "comprende" incluye también realizaciones en las que el término "comprende" significa "consiste en".

[0037] Tal como se utiliza en el presente documento "identidad" de aminoácido o molécula de ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o molécula de ácido nucleico.

60 [0038] La frase "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una molécula de ácido nucleico sonda se hibridará con su secuencia de molécula de ácido nucleico diana, habitualmente en una mezcla compleja de moléculas de ácido nucleico, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Los parámetros de hibridación de ácidos nucleicos se pueden encontrar en referencias que recopilan tales procedimientos, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al, eds,

Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser de aproximadamente 5-10°C más baja que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_f es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH, y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (dado que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_f , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,0 M de ión de sodio, habitualmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayor que 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes, tal como formamida. Para una hibridación de alta rigurosidad, una señal positiva es al menos dos veces la base, preferiblemente 10 veces la hibridación de base. Las condiciones de hibridación rigurosas o de alta rigurosidad de ejemplo incluyen: 50% de formamida, 5x SSC y SDS al 1% incubación a 42°C o 5x SSC y SDS al 1%, incubación a 65°C, con un lavado en 0,2 x SSC y SDS al 0,1% a 65°C.

[0039] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "*actividad de tipo microcina*" de un polipéptido significa que el polipéptido ejerce una potente actividad antibacteriana/antimicrobiana contra especies estrechamente relacionadas. Significa, además, que los productores de microcina son resistentes a la microcina que producen, que está mediada por al menos un gen que confiere resistencia situado dentro de un grupo de genes.

[0040] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "*plásmido*" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de replicación en una célula y a la que otra molécula de ácido nucleico puede estar unida operativamente a fin de llevar a cabo la replicación del segmento unido. Los plásmidos capaces de dirigir la expresión de un gen estructural que codifica un polipéptido de la invención se denominan en el presente documento como "plásmidos de expresión".

[0041] Tal como se utiliza en este documento, la expresión "*unida operativamente*" significa que la molécula de ácido nucleico de la invención se une al plásmido de modo que la expresión del gen estructural formado por la molécula de ácido nucleico está bajo el control del plásmido.

[0042] El término "*secuencia reguladora*" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación).

[0043] En este documento, el término "plásmido conjugativo" se refiere a un plásmido que se puede mover de una célula a otra durante el proceso de conjugación.

[0044] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en el sector para introducir un ácido nucleico exógeno (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo coprecipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación.

[0045] El término "*probiótico*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a microorganismos vivos, que tras la ingestión en cierto número, ejercen efectos positivos sobre la salud más allá de la nutrición básica inherente.

[0046] Tal como se utiliza en el presente documento una "*composición farmacéutica*" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento, es decir, el polipéptido según la invención (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) o la célula según la invención con otros componentes químicos, tales como portadores y excipientes fisiológica y farmacéuticamente aceptables. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

[0047] En lo sucesivo, las expresiones "*portador fisiológicamente aceptable*" y "*portador farmacéuticamente aceptable*" que se pueden utilizar indistintamente se refieren a un portador o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Uno de los ingredientes incluidos en el portador farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio rango de solubilidad en medios orgánicos y acuosos (Mutter et al. (1979).

[0048] En este documento el término "*excipiente*" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un principio activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

[0049] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "*crear*" se refiere a prevenir, curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos perjudiciales de un proceso de enfermedad. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "*sujeto*" se refiere a un sujeto que puede beneficiarse de la presente invención, tal como un animal o mamífero (por ejemplo, canino, felino, ovino, porcino, equino, bovino, humano), preferiblemente un

sujeto humano.

[0050] En este documento, el término "trastorno gastrointestinal funcional" abarca una serie de trastornos idiopáticos separados que afectan a diferentes partes del tracto gastrointestinal.

Polipéptidos

[0051] El polipéptido microcina S de la presente invención se caracteriza por su secuencia de restos de aminoácidos y nuevas propiedades funcionales. Los polipéptidos se pueden aislar usando procedimientos conocidos en la técnica. Es decir, un polipéptido S microcina de origen natural o producido de manera recombinante se puede aislar de células o fuentes de tejido mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. Sin embargo, los polipéptidos microcina S pueden ser de origen natural en una célula o pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o alternativamente a la expresión recombinante, un polipéptido microcina S se puede sintetizar químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptidos estándar. En este documento, el polipéptido microcina S se clasifica como un microcina de *E. coli* que se ha caracterizado fenotípicamente y se ha denominado como microcina S. La figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos de precursor de microcina S en el panel superior. Un péptido líder doble de glicina está subrayado. Los asteriscos indican cisteínas posiblemente implicadas en la formación de un enlace disulfuro típico para microcinas de clase II. La secuencia de aminoácidos representa un péptido rico en glicinas con un sitio de escisión de doble glicina. Los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o la SEQ ID No: 7 o variantes biológicamente activas de polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o la SEQ ID No: 7 se pueden utilizar en los procedimientos descritos en el presente invención.

[0052] Por lo tanto, en una realización preferida, el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 7.

[0053] Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda de aminoácidos o ácido nucleico para la alineación óptima).

[0054] En una realización preferida, el polipéptido está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que es al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma.

[0055] Los residuos en las posiciones correspondientes se comparan a continuación y cuando una posición en una secuencia está ocupada por el mismo residuo que la posición correspondiente en la otra secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre dos secuencias, por lo tanto, es función del número de posiciones idénticas compartidas por las dos secuencias (es decir, % de identidad = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se introducen para la alineación óptima de las dos secuencias.

[0056] La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 5873. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas por BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, Gapped BLAST se puede utilizar tal como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Research 25 (17): 3389. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo preferido no limitante de un algoritmo utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0 o 2.0U) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de peso de residuo PAM120, una longitud de penalización de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Los algoritmos adicionales para el análisis de secuencia son conocidos en la técnica, e incluyen ADVANCE y ADAM, descritos en Torelli y Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci. 10: 3; y FASTA, descrito en Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 2444.

[0057] En una realización adicional, el polipéptido tiene actividad de tipo microcina, actividad antimicrobiana,

antibacteriana o antitumoral. El polipéptido es un polipéptido bacteriano, preferiblemente microcina S. bacteriana. Además, el polipéptido inhibe la adhesión bacteriana a las células epiteliales intestinales humanas. Es decir, tiene que entenderse que el polipéptido proporciona actividad antimicrobiana/antibacteriana frente a especies estrechamente relacionadas, mientras que el polipéptido no ejerce actividad antibacteriana/antimicrobiana contra su productor que es resistente a la microcina que produce. Por lo tanto, el polipéptido inhibe la adhesión de las especies bacterianas estrechamente relacionadas con las células epiteliales intestinales humanas.

[0058] Preferiblemente, el polipéptido es obtenible a partir de una cepa de *E. coli*, más preferiblemente de *E. coli* G3/10. En otras realizaciones, el *E. coli* G3/10 es *E. coli* G3/10 DSM 16443.

[0059] Se prefiere además que el polipéptido sea biodegradable.

Moléculas de ácido nucleico

[0060] El genoma del probiótico *E. coli* cepa G3/10 se secuenció completamente utilizando la tecnología "pirosecuenciación" y, posteriormente, se anotó de forma automática y se editó posteriormente de forma manual.

[0061] *E. coli* G3/10 tiene un genoma de 4.935.403 pb y seis plásmidos con un tamaño de entre 1,3 kb y 50 kb. 40 kb del plásmido de 50 kb llamado pSYM1 son casi completamente idénticos (99% de homología) con pMAS2027 de una *E. coli* uropatógena (Ong, CL, Beatson, SA, McEwan, AG & Schembri, MA (2009) Appl Environ Microbiol 75, 6783-6791). Los 10 kb restantes contienen marcos de lectura con ninguna o sólo una baja homología con secuencias de nucleótidos y de aminoácidos depositadas en las bases de datos del NCBI y ExPASy. Cuatro de estos genes codifican una microcina de *E. coli* de clase IIA completamente nueva, no descrita previamente, que incluye la inmunidad y el sistema de transporte. Este grupo de genes de microcina S (SEQ ID No: 1) que consiste en los cuatro genes agrupados *mcsS* (SEQ ID No: 2), *mcsI* (SEQ ID No: 3), *mcsA* (SEQ ID No: 4) y *mcsB* (SEQ ID No: 5) se ha aislado. Esta microcina se caracterizó genotípicamente y denominó microcina S. Los dos genes de exportación de MccS son *mcsA* y *mcsB* (figura 2). El gen *mcsA* es un miembro de la familia de hemolisinas HlyD de *E. coli* y muestra una pequeña homología con la proteína de secreción de colicina *cvaA*. El gen *mcsB* codifica un transportador ABC con dos regiones de dominios transmembrana y un dominio peptidasa. Ambos genes de exportación de MccS que son *mcsA* y *mcsB* codifican polipéptidos que son responsables para el transporte de microcina S desde el citoplasma celular, particularmente citoplasma bacteriano, al espacio extracelular.

[0062] Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 5 o de una cualquiera de las SEQ ID NOs 8-26 o una parte de la misma, puede aislarse utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información de la secuencia proporcionada en este documento. Por ejemplo, usando toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1 a 5 o de una cualquiera de SEQ ID NOs 8-26 como sonda de hibridación, las moléculas de ácido nucleico de microcina S se pueden aislar utilizando las técnicas de hibridación y clonación estándar (por ejemplo, tal como se describe en Sambrook, J. et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.).

[0063] Un ácido nucleico de la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o alternativamente, ADN genómico, como plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados según técnicas estándar de amplificación por PCR. En el presente documento se describen a continuación más cebadores útiles. El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias de nucleótidos de microcina S se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado.

[0064] En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma.

[0065] En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 7.

[0066] En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido bacteriano, preferiblemente microcina S bacteriana.

[0067] Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico se puede obtener a partir de una cepa de *E. coli*, más preferiblemente de *E. coli* G3/10. En una realización específica, la molécula de ácido nucleico se puede obtener a partir de *E. coli* G3/10 DSM 16443.

Cebador o sonda de ácido nucleico

[0068] La secuencia de nucleótidos determinada a partir de la clonación de genes de microcina S permite la generación de sondas y cebadores diseñados para su uso en la amplificación del gen de microcina S de la invención y/o la identificación de genes de microcina S en otras especies.

[0069] Por lo tanto, la presente invención proporciona además moléculas de ácido nucleico como cebadores o sondas que comprenden una secuencia que se hibrida con una molécula de ácido nucleico según la invención en condiciones rigurosas. Dicho cebador o sonda de ácido nucleico comprende una secuencia de al menos 15 bases consecutivas.

[0070] El cebador o sonda de ácido nucleico comprende habitualmente un oligonucleótido sustancialmente purificado.

[0071] En una realización preferida, el cebador o sonda de ácido nucleico se hibrida a al menos aproximadamente 12 o 15, preferiblemente aproximadamente 20 o 25, más preferiblemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, o 100 nucleótidos consecutivos de una secuencia de sentido de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma o de una variante alélica de origen natural o mutante de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 o 5. En una realización, el cebador o sonda de ácido nucleico se hibrida a una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 o 5 o un complemento de la misma en condiciones rigurosas.

[0072] En una realización más preferida, el cebador o sonda de ácido nucleico comprende al menos una de SEQ ID No: 8 a SEQ ID No: 26. Las secuencias de cebadores o sondas de ácido nucleico habituales se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1: Oligonucleótidos (sintetizados por Biomers, Alemania)

Oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Función
contig49_for SEQ ID N°: 8	cagctggatatcctgcgcg	cebador de secuenciación pSYM1
contig49_rev SEQ ID No: 9	gggtgcccgcatccaacg	secuenciación de cebador pSYM1
pSYM1-Sa1IHF SEQ ID No: 10	tcaattgtgtcgactcaattactctgtgag	cebador de clonación pAZ6/pAZ8
pSYM1-NheI SEQ ID No: 11	catgtaatagtgtgctagcatgttaaaattataag	clonación del cebador pAZ6
pSYM1-NheIac SEQ ID No: 12	caaaaataatagctagcaagtgtgtttgtaatg	clonación del cebador pAZ8, pAZ12
ac-EcoRI SEQ ID No: 13	ctcgaattcatcattacaaaacatcac	cebador de clonación pAZ9
ac-PstI SEQ ID No: 14	ctggctgcagtaattgttcaggaagtaacg	cebador de clonación pAZ9
pSYM1_44-EcoRI SEQ ID No: 15	taggaattcagaggaactattggtggg	
pSYM1_44-PstI SEQ ID No: 16	ctccgctgcagacttacttatcgactacaggtaccac	cebador de clonación pAZ10
ab-EcoRI SEQ ID No: 17	gtagaattcataagagggattttatgtcaaatatc	cebador de clonación pAZ11
ab-PstI SEQ ID No: 18	gtagactgcagcttatcgactacaggtaccacc	cebador de clonación pAZ11
pAZ9-HindIII SEQ ID No: 19	ccaagcttagttaaattgtgtaattgctgtc	cebador de clonación pAZ12
pAZ9-Sall SEQ ID No: 20	ggcatcggtcgacgcaac	cebador de clonación pAZ12
pSYM1_43-NheI SEQ ID No: 21	cattgctagccatcacagataaaactggataac	cebador de clonación pAZ14
pSYM1_43-Sall SEQ ID No: 22	ccctgagtcgactcatggttataaaatatttg	cebador de clonación pAZ13, pAZ14
recA-ff SEQ ID N°: 23	atggctatcgacgaaaacaac	control de inhibición interna
recA-rev SEQ ID N°: 24	ttaaaaatcttcgtagtttctgc	control de inhibición interna
mcsS-ff SEQ ID No: 25	atgtcaaatatcagagaattgag	cebador de cribado <i>mcsS</i>
mesS-rev SEQ ID No: 26	ttatcgactacaggtaccacc	cebador de cribado <i>mcsS</i>

[0073] Los cebadores o sondas de ácido nucleico según la invención se usan para amplificar o cribar una molécula de ácido nucleico según la invención.

5 [0074] Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico o partes de las mismas se pueden amplificar, por ejemplo, por PCR u otra técnica de amplificación bien conocida en el sector, y las moléculas de ácido nucleicos amplificadas o partes de las mismas se pueden secuenciar por procedimientos conocidos en la técnica. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, que comprende la desnaturalización, hibridación y extensión de ácidos nucleicos, y durante el proceso de hibridación, tiene lugar la hibridación de una sonda y un ácido nucleico diana. Las condiciones para la PCR pueden alterarse según el grado de homología entre la sonda y el ácido nucleico diana. Cuando se eleva la temperatura de hibridación bajo condiciones de PCR determinadas, disminuye el rendimiento de los productos de hibridación no específica, mientras que, cuando se disminuye la temperatura de hibridación, se aumenta el rendimiento de productos de hibridación no específica. Véase, por ejemplo, J. Sambrook y David W. Russell: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2000).

10 [0075] Las sondas descritas en este documento se pueden usar además para detectar moléculas de ácido nucleico de la invención en diversos tipos de células. Por ejemplo, los cebadores o sondas de ácido nucleico según la invención se pueden utilizar para cribar una molécula de ácido nucleico según la invención usando PCR multiplex. Una PCR multiplex permite la amplificación simultánea de diferentes genes que están destinados a la amplificación, en la misma reacción. Es decir, los diferentes conjuntos de cebadores que son capaces de amplificar sus respectivas secuencias diana se colocan en un reactor, y se realizan simultáneamente amplificaciones de las secuencias diana en una sola reacción PCR (véase, por ejemplo Wittwer CT, et al., *Real-time multiplex PCR assays. Methods* 25 (4): 430-442, (2001); Markoulatos P., et al, *Multiplex PCR: rapid DNA cycling in a conventional thermal cycler. J. Clin Lab Anal* 17 (4): 108-112, (2003); O. Henegariu, et al, *Multiplex PCR: Critical parameters an Step-by-Step Protocol. BioTechniques* 23: 504-511, (1997); y Markoulatos P., et al, *Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J. Clin Lab Anal* 16 (1): 47-51, (2002).

Plásmidos

30 [0076] Los plásmidos son un tipo de un vector, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Ciertos plásmidos son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se producen o en la que se introducen (por ejemplo, plásmidos bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episomales).

35 [0077] Además, ciertos plásmidos son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento como "*plásmidos de expresión*".

40 [0078] *E. coli* G3/10 tiene seis plásmidos con un tamaño entre 1,3 kb y 50 kb. 40 kb del plásmido de 50 kb llamado pSYM1 (Figura 1) son casi completamente idénticos (99% de homología) con pMAS2027 de una *E. coli* uropatógena. Los 10 kb restantes contienen marcos de lectura con ninguna o sólo una baja homología con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos depositadas en las bases de datos del NCBI y ExpASY. Cuatro de estos genes codifican una microcina de *E. coli* de clase IIA completamente nueva, no descrita previamente, que incluye la inmunidad y el sistema de transporte. Este grupo de genes de microcina S (SEQ ID No: 1) que consiste en los cuatro genes agrupados *mcsS* (SEQ ID No: 2), *mcsI* (SEQ ID No: 3), *mcsA* (SEQ ID No: 4) y *mcsB* (SEQ ID No: 5) se ha aislado.

50 [0079] Por lo tanto, un plásmido puede comprender la molécula de ácido nucleico de la invención. En una realización preferida, el plásmido es un plásmido de expresión.

[0080] Los plásmidos de expresión de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula, lo que significa que los vectores de expresión de origen natural o recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas según las células huésped a utilizar para la expresión, que están operativamente ligadas a la secuencia de ácido nucleico a expresar.

[0081] Por consiguiente, se prefiere adicionalmente que un elemento regulador del plásmido se una operativamente a la molécula de ácido nucleico de la invención.

60 [0082] En otra realización, el plásmido es un plásmido conjugativo.

[0083] Los plásmidos utilizados en este documento se muestran en la Tabla 2:

65

TABLA 2. Plásmidos utilizados

Plásmido	Resistencia	Genotipo relevante	Origen
pSYM1		<i>mcsS, mcsI, mcsA, mcsB</i>	este trabajo
pST76-A	Amp ^r	ori ^{TS(30°C)}	Pósfai, G., M.D. Koob, H.A. Kirkpatrick, y F.R. Blattner. 1997. J. Bacteriol. 179: 4426-4428
pSYM1-ST76An	Amp ^r	<i>mcsS, mcsI, mcsA, mcsB</i>	este trabajo
pAZ6	Amp ^r	<i>mcsS, mcsI, mcsA, mcsB</i>	este trabajo
pAZ8	Amp ^r	<i>mcsI, mcsA, mcsB</i>	este trabajo
pAZ9	Cm ^r	<i>mcsS</i>	este trabajo
pAZ10	Cm ^r	ORF1	este trabajo
pAZ11	Cm ^r	ORF2	este trabajo
pAZ12	Cm ^r	<i>mcsS</i> ₁₉₃₋₃₆₃	este trabajo
pAZ13	Amp ^r	<i>mcsI</i>	este trabajo
pAZ14	Amp ^r	<i>mcsI</i> ₃₆₁₋₆₅₁	este trabajo

Células

5 [0084] Una célula puede ser una célula huésped que puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido microcina S se puede expresar en células bacterianas, tales como *E. coli*, que se prefiere en el presente documento, o células de insecto, células de levadura o de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células huésped adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

10 [0085] El ADN de plásmido puede ser de origen natural en la célula o se puede introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Los procedimientos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2^a ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.), y en otros manuales de laboratorio.

15 [0086] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una célula que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención, y/o el polipéptido de la reivindicación 1 y/o un plásmido de la presente invención.

20 [0087] La molécula de ácido nucleico puede estar integrada en el genoma de la célula de la invención (célula objeto) o, preferiblemente en un plásmido en la célula objeto.

[0088] Se prefiere que la célula objeto sea una célula bacteriana. Por ejemplo, la célula es una célula de *E. coli*, preferiblemente de *E. coli* DSM 17252, lo más preferiblemente una célula de *E. coli* G3/10.

25 [0089] La célula objeto también puede ser una célula huésped recombinante.

[0090] En una realización preferida, la célula objeto es una célula probiótica. Por tanto, la célula tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana o antitumoral. Tiene que entenderse que la célula proporciona actividad antimicrobiana contra las especies estrechamente relacionadas, mientras que la célula no ejerce actividad antimicrobiana contra su productor que es resistente a la microcina que produce.

[0091] Por tanto, la célula objeto inhibe la adhesión bacteriana a células epiteliales intestinales humanas.

35 [0092] Las células que comprenden de forma natural los ácidos nucleicos, polipéptidos o plásmidos de la invención y que específicamente no están en forma aislada se excluyen de las reivindicaciones de la presente solicitud.

Anticuerpos

40 [0093] Se utiliza un inmunógeno no microcina S inmunógena habitualmente para preparar anticuerpos inmunizando un sujeto adecuado, (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, un polipéptido microcina S de origen natural o expresado de forma recombinante o un péptido microcina S sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como un adyuvante completa o incompleta de Freund, o un agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto adecuado con una preparación de microcina S inmunogénica induce una respuesta de anticuerpos policlonales anti-microcina S. Tales procedimientos son conocidos en la técnica.

50 [0094] Por lo tanto, se pueden preparar anticuerpos policlonales anti-S microcina tal como se describe anteriormente inmunizando un sujeto adecuado con un inmunógeno de microcina S. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra el polipéptido microcina S se pueden aislar de un mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A para obtener la fracción

IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo anti-microcina S son más altos, las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497 (véase también, Brown et al (1981) *J. Immunol* 127: 539-46; Brown et al (1980) *J. Biol Chem* 255: 4980-83; Yeh et al (1976) *Proc Natl Acad Sci USA*. 76: 2927-31; y Yeh et al (1982) *Int J. Cancer* 29: 269-75), la técnica de hibridoma de células B humanas más recientes (Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales es bien conocida (véase en general Kenneth, R.H. en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analysis*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York (1980); Lerner, EA (1981) *Yale J. Biol. Med* 54: 387-402; Gefter, ML et al (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3: 231-36). Brevemente, una línea celular inmortal (habitualmente un mieloma) se fusiona a linfocitos (habitualmente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno de microcina S, tal como se describe anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se criban para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido microcina S.

[0095] Por consiguiente, en realizaciones, la presente invención también se refiere a anticuerpos que se unen selectivamente a un polipéptido que es un polipéptido microcina S. En vista del principio bien establecido de reactividad inmunológica cruzada, la presente invención por lo tanto contempla variantes relacionadas antigénicamente del polipéptido de SEQ ID No: 6 o de la SEQ ID No: 7. Una "variante relacionada antigénicamente" es un polipéptido que incluye al menos una parte de secuencia de seis residuos de aminoácidos de un polipéptido de la SEQ No: 6 o de la SEQ ID No: 7 y que es capaz de inducir moléculas de anticuerpos que reaccionan inmunológicamente con un polipéptido de SEQ ID No: 6 o de SEQ ID No: 7. Los anticuerpos pueden ser sintéticos, monoclonales, o policlonales y se pueden producir mediante técnicas bien conocidas en el sector.

Composiciones y composiciones farmacéuticas

[0096] El polipéptido microcina S o incluso una célula de la invención se pueden incorporar en una composición o una composición farmacéutica que son adecuadas para la administración. En consecuencia, la presente invención contempla una composición que comprende un polipéptido según la invención o una célula según la invención.

[0097] En una realización preferida adicional, la composición es una composición acuosa.

[0098] En una realización adicional, la composición tiene actividad antimicrobiana, antibacteriana o antitumoral. Por tanto, la composición inhibe la adhesión bacteriana a células epiteliales intestinales humanas.

[0099] En una realización preferida, la composición es una composición probiótica. Preferiblemente, la composición probiótica comprende una mezcla de microorganismos probióticos, de preferencia de *E. coli* DSM 17252. Por ejemplo, la composición comprende células y/o autolisados de al menos uno de *E. coli* G1/2 (DSM 16441), G3/10 (DSM 16443), G4/9 (DSM 16444), G5 (DSM 16445), G6/7 (DSM 16446) y G8 (DSM 16448) o una mezcla de los mismos. Una composición puede contener autolisatos así como las células en una cantidad de $3,00 \times 10^6$ a $2,25 \times 10^8$ células por 1 ml, preferiblemente de $1,5$ a $4,5 \times 10^7$ células por 1 ml. Preferiblemente, la composición comprende autolisados, así como células, de bacterias de *E. coli* y aditivos adicionales. Pos consiguiente, la invención proporciona una composición probiótica que comprende al menos una de las cepas bacterianas *E. coli* G1/2 (DSM 16441), G3/10 (DSM 16443), G4/9 (DSM 16444), G5 (DSM 16445), G6/7 (DSM 16446) y G8 (DSM 16448), es decir, una de las cepas mencionadas anteriormente o cualquier cepa bacteriana seleccionada por el procedimiento de la invención, en la que la composición comprende al menos 1 cepa, preferiblemente de 2 a 3 cepas, más preferiblemente de 2 a 4 cepas, incluso más preferiblemente de 2 a 5 cepas y lo más preferiblemente de 2 a 6 cepas, y en la que cada una de las cepas está presente en la composición en una proporción de 0,1% a 99,9%, preferiblemente de 1% a 99%, más preferiblemente de 10% a 90%. En una realización preferida, la composición comprende al menos una de las cepas bacterianas de la invención junto con otra cepa o mezcla de las cepas, en la que la mezcla comprende preferiblemente de 2 a 6 cepas, más preferiblemente de 2 a 4 cepas, lo más preferiblemente de 2 a 3 cepas y en la que cada una de las cepas está presente en la composición en una proporción de 0,1% a 99,9%, preferiblemente de 1% a 99%, más preferiblemente de 10% a 90%. Las composiciones probióticas de la invención están preferiblemente en una forma liofilizada, en forma congelada o incluso muerta. En una realización preferida, una composición probiótica comprende uno o más microorganismos probióticos y un portador que funciona para transportar dicho uno o más microorganismos probióticos en el tracto gastrointestinal, el portador puede comprender almidón resistente modificado o no modificado en forma de almidones ricos en amilosa o mezclas de los mismos. El portador actúa como un medio de crecimiento o mantenimiento para microorganismos en el tracto gastrointestinal de manera que los microorganismos probióticos están protegidos durante el paso al intestino grueso u otras regiones del tracto gastrointestinal.

[0100] En una realización preferida, la composición puede ser además una composición farmacéutica. Por tanto, la composición farmacéutica comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o la célula y uno o más adyuvantes, excipientes, portadores, y/o diluyentes. Los diluyentes, portadores y excipientes aceptables

normalmente no afectan negativamente a la homeostasis de un receptor (por ejemplo, el equilibrio de electrolitos). Los portadores aceptables incluyen sales biocompatibles, inertes o bioabsorbibles, agentes tamponantes, oligosacáridos o polisacáridos, polímeros, agentes mejoradores de la viscosidad, conservantes y similares. Más detalles sobre técnicas para la formulación y administración de las composiciones farmacéuticas se pueden encontrar en, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

[0101] Entre los ejemplos de aditivos incluyen glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y similares. Ejemplos de aditivos que se pueden añadir para proporcionar un color deseable, sabor, estabilidad, capacidad tamponante, dispersión u otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, gel de sílice, lauril sulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y similares. Se pueden utilizar diluyentes similares para preparar comprimidos.

[0102] En realizaciones, los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

[0103] Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan para ser compatibles con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal.

[0104] Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

[0105] Las composiciones adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0106] La administración oral se puede aplicar en forma de una cápsula, líquido, comprimido, píldora, o formulación de liberación prolongada.

[0107] Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden estar incluidos en cápsulas de gelatina o comprimidos en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un portador fluido, en el que el compuesto en el portador fluido se aplica por vía oral y se agita y se expectora o se traga. Se pueden incluir como parte de la composición agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes. La composición oral puede contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: una sal, tal como cloruro de sodio o sulfato de magnesio, tal como sulfato de magnesio · 7 H₂O, cloruro de potasio, cloruro de calcio, tal como cloruro de calcio · 2 H₂O, cloruro de magnesio, tal como cloruro de magnesio · 6 H₂O, agua purificada, un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante, tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

[0108] Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de una pulverización de aerosol de envase a presión o dispensador que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

[0109] La administración sistémica también puede ser por vía transmucosal o transdérmica. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan penetrantes apropiados para la barrera a permear en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal puede lograrse a través del uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas, tal como se conoce generalmente en la técnica.

[0110] Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

[0111] En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se pueden usar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.522.811.

[0112] Es especialmente ventajoso formular composiciones orales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de componer dicho compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

[0113] En una realización alternativa, la composición puede ser un desinfectante para superficies. Por lo tanto, el uso de la composición de desinfección de superficies también se contempla en el presente documento.

[0114] En una realización preferida, la composición de desinfección comprende, además, cuando proceda, una sustancia tensioactiva (tensioactivo) o mezcla de sustancias, sustancias aromáticas, adyuvantes y aglutinantes.

[0115] En otra realización, la composición de desinfección comprende adicionalmente un aglutinante y, opcionalmente, sustancias aromáticas y colorantes y adyuvantes, tales como sustancias para ablandar el agua, cargas y similares, y está disponible en forma líquida, en forma de comprimidos o en forma de granulado.

[0116] Preferiblemente, la composición de desinfección es seguro para los alimentos.

[0117] La composición de desinfección además protege contra microbios patógenos con resistencia a los antibióticos.

Kits

[0118] También se proporcionan kits que comprenden, en uno o más recipientes, una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de la composición de la invención. El kit puede incluir opcionalmente instrucciones para realizar los usos médicos destinados, tal como se describe en el presente documento, o para llevar a cabo los procedimientos proporcionados.

Usos médicos del polipéptido, la célula, las composiciones y el kit

[0119] Dado que el polipéptido; la célula y la composición muestran actividad antimicrobiana, antibacteriana o antitumoral, la invención se refiere además a sus usos médicos en terapia o prevención.

[0120] Específicamente, se pueden usar en el tratamiento o la prevención de infecciones microbianas. Además, se utilizan en el tratamiento y la profilaxis de trastornos gastrointestinales, por ejemplo, trastornos gastrointestinales funcionales, en una realización en el tratamiento y la profilaxis de la diarrea.

[0121] En una realización preferida, la infección microbiana comprende infecciones con *E. coli* enteropatógena y/o enterohemorrágica (EPEC, EHEC). En una realización adicional, la infección microbiana comprende el síndrome urémico hemolítico (SHU), preferiblemente síndrome urémico hemolítico enteropático. La invención, sin embargo, no

se limita a enfermedades causadas por EPEC o EHEC, sino también comprende el tratamiento o profilaxis de enfermedades causadas por otros microorganismos que son responsables de trastornos gastrointestinales, tales como la diarrea, por ejemplo, *Salmonella spec.*, *Shigella spec.* y *Yersinia spec.*

5 **[0122]** En una realización preferida, la infección microbiana comprende una infección por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Es decir, la cepa del brote H4:O104 de *E. coli* enterohemorrágica o cualquier otra EHEC susceptible a microcina S. En una realización más preferida, la infección microbiana comprende una infección por *E. coli* que produce la toxina Shiga. La *E. coli* productora de la toxina Shiga puede ser una *E. coli* enterohemorrágica. Junto a
10 otros factores de virulencia, las toxinas Shiga (Stx 1; Stx 2; Stx 1,2) son responsables de la diarrea severa, sobre todo con sangre, y la aparición del síndrome urémico hemolítico. Las células de EHEC liberan mayores cantidades de toxinas Shiga por tratamiento con ciertos antibióticos. Por lo tanto, se describe que el tratamiento de pacientes con antibióticos está contraindicado. Mediante el tratamiento de la infección microbiana usando el polipéptido objeto; la célula objeto o la composición de la invención, se puede inhibir la producción de la toxina Shiga.

15 **[0123]** En otras realizaciones, la infección microbiana comprende una infección por *E. coli* enteropatógena.

[0124] En realizaciones, la infección microbiana comprende una infección por enterobacterias que producen beta-lactamasa de espectro mejorado. Preferiblemente, la infección microbiana comprende una *E. coli* productora de beta-lactamasas de espectro mejorado.

20 **[0125]** En realizaciones, el polipéptido objeto; la célula objeto o la composición de la invención inhiben los microbios que causan la infección microbiana en una proporción de 1:1000, preferiblemente 1:500, más preferiblemente 1:100, incluso más preferiblemente 1:50, lo más preferido 1:20 o incluso de 1:1 a 1:10.

25 **[0126]** En una realización alternativa, el polipéptido objeto; la célula objeto; la composición de la invención o el kit de la invención son para su uso en el tratamiento de trastornos gastrointestinales funcionales, el síndrome del intestino irritable preferiblemente. Se prefiere que se utilicen en el tratamiento de adultos y niños.

30 **[0127]** En otra realización alternativa, el polipéptido; la célula; la composición o el kit es para su uso en el tratamiento de un tumor. Son capaces, aunque en diversos grados, de inhibir el crecimiento de células tumorales. Preferiblemente, un polipéptido S microcina puede inducir apoptosis en líneas celulares humanas. Por ejemplo, el polipéptido, la molécula de ácido nucleico, la célula o una composición según la invención se pueden aplicar a un sujeto usando vías de administración, tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, por vía intravenosa. El polipéptido, la molécula de ácido nucleico o de la célula se pueden acumular en un tumor. Si se
35 administra la célula objeto, la célula puede acumularse en el tumor y producir el polipéptido según la invención. El polipéptido también puede expresarse a partir de la molécula de ácido nucleico objeto o puede liberarse de la composición. La microcina S se puede colocar bajo el control de un promotor activo de tumor. El polipéptido; la célula o la composición se administran a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración farmacéutica.

40 **[0128]** El polipéptido; la célula; la composición o el kit deben inducir a niveles significativos la apoptosis en las células tumorales, a la vez que no den lugar a ningún efecto en los sistemas de células normales.

45 **[0129]** Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos que pueden tratarse y/o prevenirse mediante el uso del polipéptido; la célula; la composición o el kit son tumores en general, en particular cáncer colon-rectal, cáncer de hígado, gliomas, neuroblastomas, carcinoma oral escamocelular, tumores linfoides, cáncer de la glándula prostática, cáncer de la vejiga, cáncer de mama, cáncer de la pleura y el peritoneo.

50 **[0130]** En algunas realizaciones descritas en este documento, el polipéptido; la célula o la composición, se pueden administrar a un sujeto en forma parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal, preferiblemente en una forma oral.

55 **[0131]** El polipéptido; la célula o la composición, se pueden administrar a un sujeto en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido; la célula o las composiciones de la presente invención se define como una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido; una célula o una composición pueden variar según factores, tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del polipéptido; la célula o las composiciones para provocar una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la
60 respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente tal como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

[0132] Con el fin de optimizar la eficacia terapéutica, un polipéptido S microcina se administra a diferentes regímenes de dosificación en diferentes puntos de tiempo.

65 **[0133]** Al sujeto se le puede administrar una sola dosis eficaz farmacéuticamente o dosis múltiples

farmacéuticamente eficaces, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más. Específicamente, al sujeto se le puede administrar una sola dosis farmacéuticamente eficaz 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más veces al día.

5 [0134] Específicamente, al sujeto se le puede administrar una dosis de 5-15 gotas de una composición acuosa. Más preferiblemente, se administra una dosis de 10 gotas. En dicha realización, 1 ml contiene aproximadamente 14 gotas.

10 [0135] Una cantidad farmacéuticamente eficaz (es decir, una dosis farmacéuticamente eficaz) oscila de aproximadamente 0,001 a 30 mg/kg de peso, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, y aún más preferiblemente de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, 2 a 9 mg/kg, 3 a 8 mg/kg, 4 a 7 mg/kg, o 5 a 6 mg/kg de peso.

15 [0136] Las administraciones de dosis múltiples pueden separarse por intervalos de horas, días, semanas o meses. En otras realizaciones, se administran al menos una vez, dos veces o tres veces al día con las comidas dentro de agua, preferiblemente tres veces al día con las comidas dentro de agua.

20 [0137] Se pueden opcionalmente administrar al sujeto durante un periodo limitado de tiempo y/o en un número limitado de dosis. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración al sujeto se puede terminar (es decir, no se suministran más administraciones) durante, por ejemplo, un año, seis meses, un mes, o dos semanas. Por ejemplo, la administración suministrada se puede terminar después de seis meses. En enfermedades crónicas, puede ser necesario aumentar el período hasta seis meses.

25 [0138] En algunas realizaciones, la dosis puede aumentarse al cabo de 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, tres semanas, cuatro semanas o más. La dosis a administrar a un sujeto puede aumentarse a 15-25 gotas, más preferiblemente a 20 gotas, de una composición acuosa.

30 [0139] En los niños, se pueden administrar en una forma oral de 5-15 gotas de una composición acuosa. Más preferiblemente, se administran 10 gotas a un niño. En otras realizaciones, se administran a un niño al menos una vez, dos veces o tres veces al día con las comidas dentro de agua, preferiblemente una vez al día con las comidas dentro de agua.

35 [0140] En todas las realizaciones de uso médico, el polipéptido; la célula; la composición o el kit de la invención, se administran, al inicio del tratamiento a un adulto, 10 gotas tres veces al día con las comidas dentro de agua y la dosis se incrementa después de 1 semana a 20 gotas y para un niño 10 gotas de una vez por día con las comidas dentro del agua.

Procedimiento para producir el polipéptido microcina S

40 [0141] Los polipéptidos de la presente invención pueden ser un producto purificado de forma natural, o un producto de procedimientos sintéticos químicos, o producido por técnicas recombinantes a partir de un huésped procarionta o eucariota (por ejemplo, por células de bacterias, levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos en el cultivo).

45 [0142] Específicamente, una célula de la invención, tal como una célula huésped procarionta o eucariota en cultivo, puede utilizarse para producir (es decir, expresar) un polipéptido microcina S. Por consiguiente, la invención proporciona además procedimientos para producir un polipéptido microcina S usando las células de la invención.

50 [0143] En el presente documento se contempla un procedimiento para producir el polipéptido objeto, microcina S. Dicho procedimiento comprende: el uso de una molécula de ácido nucleico, un cebador o sonda de ácido nucleico, un plásmido o una célula según la invención, o la síntesis del polipéptido según la invención por medio de técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase en solución.

55 [0144] En una realización preferida, el procedimiento comprende las etapas de i) introducir en una célula la molécula de ácido nucleico según la invención y especificada adicionalmente en la reivindicación 2 y/o el plásmido según la invención y especificada adicionalmente en la reivindicación 3, ii) y cultivar la célula en condiciones que permiten la expresión del polipéptido a partir de dicha molécula de ácido nucleico o dicho plásmido, o sintetizar el polipéptido según la invención y también especificada en la reivindicación 0 por medio de técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase en solución.

60 [0145] En una realización preferida, el procedimiento comprende además la etapa de (iii) recuperar el polipéptido producido.

65 [0146] El polipéptido objeto aislado se produce po tanto mediante dicho procedimiento.

[0147] En algunas realizaciones, los polipéptidos microcina S son producidos por células de origen natural o,

alternativamente, por técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido microcina S puede estar ya codificado por un plásmido o puede ser insertado en un plásmido, por ejemplo, un plásmido de expresión. Utilizando el plásmido, la molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula mediante procedimientos recombinantes. Cuando se expresa en una célula, la célula se cultiva preferiblemente en condiciones que permiten la expresión de un polipéptido microcina S. El polipéptido microcina S se puede recuperar de una suspensión celular si se desea. Tal como se utiliza en este documento, "recuperado" significa que el polipéptido microcina S se extrae de aquellos componentes de una célula o medio de cultivo en el que está presente antes del proceso de recuperación. El proceso de recuperación puede incluir una o más etapas de replegamiento o purificación. Los tampones y procedimientos para inducir el plegado de un polipéptido microcina S desnaturalizado son conocidos en la técnica.

[0148] Los polipéptidos dentro del alcance de la presente invención se pueden sintetizar usando técnicas en fase en solución o en fase sólida estándar conocidas en la técnica (por ejemplo, R.B. Merrifield (1963). "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide". J. Am Chem Soc 85 (14): 2149-2154). Por lo tanto, el polipéptido objeto puede producirse mediante la condensación de un péptido parcial o aminoácido. Cuando el péptido parcial o aminoácido tiene un grupo protector, el grupo protector se separa, después de lo cual se produce el polipéptido objeto. La síntesis en fase sólida, que es una resina, se inicia a partir de aminoácidos o péptidos cuyos grupos α -amino y grupos funcionales de la cadena lateral se han protegido adecuadamente. Se condensan sobre la resina según la secuencia del polipéptido objeto mediante diversas técnicas de condensación que son conocidas per se. Al final de la serie de reacciones, el péptido o el péptido protegido se eliminan de la resina y los grupos protectores se eliminan para obtener el polipéptido objetivo. Por ejemplo, la síntesis en fase sólida se inicia desde el extremo carboxi terminal del péptido utilizando un aminoácido protegido. Los grupos protectores BOC o FMOC se pueden utilizar para todos los grupos amino, incluso cuando otros grupos protectores son adecuados. Por ejemplo, BOC-Lys-OH se puede esterificar a soportes de resina de poliestireno clorometilado. El soporte de resina de poliestireno es preferiblemente un copolímero de estireno con aproximadamente 0,5 a 2% de divinilbenceno como agente de reticulación que hace que el polímero de poliestireno sea completamente insoluble en ciertos disolventes orgánicos. Ver Stewart et al, Solid-Phase Peptide Synthesis (1969), WH Freeman Co., San Francisco.; y Merrifield, J. Am. Chem. Soc. (1963) 85: 2149-2154. Estos y otros procedimientos de síntesis de péptidos también se ejemplifican en la patente de Estados Unidos N° 3.862.925; 3.842.067; 3.972.859; y 4.105.602.

[0149] La síntesis de polipéptidos puede usar técnicas manuales o utilizando automáticamente, por ejemplo, un Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 403A (Foster City, California) o un sintetizador de péptidos automático Biosearch SAM II (Biosearch, Inc., San Rafael, California), siguiendo las instrucciones proporcionadas en el manual de instrucciones suministrado por el fabricante.

Procedimiento para la conservación de alimentos

[0150] La invención también se refiere a un procedimiento para conservar alimentos, comprendiendo el procedimiento:

- añadir a los alimentos al menos un tipo de un agente antimicrobiano natural, en el que el agente es
- a) el polipéptido según la invención;
 - y/o
 - b) la composición según la invención.

[0151] Dado que las bacterias Gram positivas y Gram negativas se encuentran casi siempre juntas en los alimentos, los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico, la célula o las composiciones dentro del alcance de la presente invención muestran eficacia hacia las bacterias, por ejemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* o *Listeria*. Más específicamente, las bacterias tales como *Salmonella typhimurium*, otras especies de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides gingivalis*, *Listeria monocytogenes* y otras.

[0152] Se ha de entender que el agente se añade en una cantidad suficiente para inhibir las bacterias contaminantes.

[0153] Preferiblemente, el polipéptido, la molécula de ácido nucleico, la célula o la composición añadida a un alimento alcanzan un efecto protector. En una realización, el polipéptido, la célula o la composición no afectan al consumo de alimentos. Por ejemplo, no tienen sabor y son no tóxicos para los seres humanos y animales.

[0154] Por lo tanto, los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico, la célula (citada sólo para referencia) o las composiciones dentro del alcance de la presente invención son particularmente adecuados para el control y prevención de la contaminación de materias primas, alimentos procesados y bebidas por patógenos bacterianos y otros organismos de desecho microbiano. Se pueden usar en conexión con un producto alimenticio que es susceptible al crecimiento bacteriano o degradación. Los usos potenciales relacionados con los alimentos incluyen el tratamiento de carnes, especialmente las aves de corral, huevos, queso, productos lácteos, frutas, productos derivados de vegetales, granos y productos derivados de cereales, alimentos enlatados, aderezos para ensaladas, bebidas fermentadas y mariscos, como el pescado, o muchos otros alimentos. Ejemplos de productos lácteos incluyen, pero no se limitan a, queso, leche, nata, y productos lácteos fermentados, tales como el yogur. Ejemplos

de carnes incluyen, por ejemplo, jamón, carne de res, embutido, pollo y pavo, incluyendo partes enteras o productos cárnicos procesados a partir de ellas. Otros productos alimenticios incluyen productos alimenticios procesados, incluyendo comidas preparadas, entrantes y carnes, ensaladas envasadas, mayonesa, aderezos (incluidos los aderezos para ensalada), salsas y condimentos, pastas, sopas, aceites comestibles, pescado y productos de pescado, productos de huevo, bebidas, alimentos envasados asépticamente, así como mezclas de los anteriores. Otros usos relacionados con los alimentos incluyen el tratamiento de los envases de alimentos y el equipo de manipulación. Otros usos incluyen como conservante de alimentos, tales como por ejemplo en queso procesado, nata, leche, productos lácteos y en la limpieza de las aves de corral, pescado, carnes o verduras.

5
10
15
20
[0155] Los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico, la célula (citada sólo para referencia) o las composiciones de la presente invención se pueden utilizar mediante la mezcla con y/o la aplicación en un producto alimenticio mezclable, pero pueden aplicarse a una superficie de productos alimenticios sólidos mediante inmersión, enjuague, o pulverización o por aplicación al interior de dichos productos, por ejemplo, mediante inyección. Se pueden aplicar como un adobo, empanado, mezclar con condimentos, glaseado, mezcla con colorantes, y similares, o como un ingrediente para mezclar con e incorporarse en el producto alimenticio. En otros aspectos, los polipéptidos, las moléculas de ácido nucleico, la célula o las composiciones pueden ponerse indirectamente en contacto con la superficie del alimento mediante la aplicación de la composición a materiales de envasado de alimentos, tales como un revestimiento o una película, y la aplicación a continuación del envasado a la superficie del alimento, de manera que la composición entra en contacto con la superficie del alimento externo. La cantidad óptima a utilizar dependerá del producto alimenticio particular a tratar y el procedimiento utilizado para aplicar la composición al alimento y/o la superficie del alimento, pero puede determinarse mediante experimentación de rutina.

25
[0156] Las ventajas son que los polipéptidos, la célula (citada sólo por referencia) o las composiciones de la presente invención son fáciles de digerir, son no tóxicos, no pueden inducir alergias, y es difícil que los microbios patógenos desarrollen resistencia en contra.

Procedimiento para la identificación de bacterias que son sensibles al polipéptido microcina S:

30
[0157] La invención se refiere además a un procedimiento *in vitro* para la identificación de bacterias que son sensibles al polipéptido microcina S. En dicho procedimiento, se puede usar el polipéptido objeto; la molécula de ácido nucleico objeto, el cebador o sonda de ácido nucleico objeto, la célula citada sólo por razones de referencia, el anticuerpo objeto o la composición objeto.

35
[0158] En una realización, el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto las bacterias patógenas que causan una infección microbiana con el polipéptido objeto; la molécula de ácido nucleico objeto, el cebador o sonda de ácido nucleico objeto, la célula objeto (citada sólo por razones de referencia), o la composición objeto, en el que la reducción de la eficacia de adhesión de la célula a las células epiteliales intestinales (enterocitos) es indicativa de la sensibilidad de la célula a microcina S.

40
[0159] Debe entenderse que la microcina S se puede añadir a las bacterias patógenas en forma de un polipéptido objeto. Sin embargo, también puede añadirse una molécula de ácido nucleico objeto a partir del cual la microcina S puede expresarse. Además, es posible añadir una célula objeto que produce microcina S. Finalmente, la composición objeto que comprende microcina S puede añadirse a las bacterias patógenas.

45
50
55
[0160] En una realización preferida, el procedimiento comprende las etapas de proporcionar un primer conjunto de células; preincubar un primer conjunto de células con el polipéptido objeto; la molécula de ácido nucleico objeto, la célula objeto, el anticuerpo objeto o la composición objeto; proporcionar un segundo conjunto de células; infección del primer conjunto de células y el segundo conjunto de células con bacterias patógenas que causan una infección microbiana; medir la eficacia de la adhesión del primer conjunto de células y del segundo conjunto de células; comparar la eficacia de adhesión del primer conjunto de células con la eficacia de adhesión del segundo conjunto de células, en el que, cuando la eficacia de adhesión del primer conjunto de células es menor que la del segundo conjunto de células, entonces las células del primer conjunto de células son sensibles a microcina S.

60
[0161] Una reducción en la eficacia adhesión de un primer conjunto de células en comparación con un sistema correspondiente de un segundo conjunto de células, en el que la microcina S no se ha agregado en forma de un polipéptido objeto; una molécula de ácido nucleico objeto, una célula objeto o la composición objeto es indicativa de la sensibilidad del primer conjunto de células a microcina S.

65
[0162] En realizaciones preferidas las células del primer conjunto de células y del segundo conjunto de células son células epiteliales intestinales humanas.

[0163] En una realización preferida, el procedimiento *in vitro* para la identificación de bacterias es una prueba de

5 difusión en agar modificado. En una primera etapa, las bacterias que causan una infección microbiana se aplican a una placa de cultivo. En una segunda etapa, se impregna un disco de papel de filtro con el polipéptido objeto; la molécula de ácido nucleico objeto, el cebador o sonda de ácido nucleico objeto, la célula objeto, el anticuerpo objeto o la composición objeto. A continuación, el papel de filtro se coloca en la superficie del agar sobre la placa de cultivo.

[0164] Esto tiene el efecto que la microcina S se difunde desde el papel de filtro al agar. Se establece un gradiente de concentración, en el que la concentración de microcina S es más alta junto al disco, y disminuye con la distancia al disco.

10 [0165] Si la microcina S es eficaz contra las bacterias a una cierta concentración, ninguna colonia crecerá donde la concentración en el agar es mayor que o igual a la concentración efectiva. Esta es la zona de inhibición. Por lo tanto, el tamaño de la zona de inhibición es una medida de la eficacia del compuesto: cuanto mayor es el área clara alrededor del disco de filtro, más eficaz será el compuesto.

15 **Procedimiento para recubrir material de apósito:**

[0166] Dentro del ámbito de la invención se encuentra un procedimiento para recubrir material de apósito, en el que el material de apósito se recubre con

- 20 a) el polipéptido según la invención; y/o
b) la composición según la invención.

25 [0167] Dado que el nuevo polipéptido microcina S de la presente invención muestra efectos antimicrobianos, se puede utilizar para recubrir material de apósito. Se debe entender que los apósitos recubiertos para grupos de sujetos, por ejemplo, tal como para los pacientes con quemaduras de primer y segundo grado, es ventajoso. Dichos sujetos necesitan protección contra las infecciones bacterianas. En una realización preferida, el material de apósito son apósitos antisépticos. En una realización más preferida, los apósitos antisépticos son parches o vendas. En realizaciones, el material de apósito recubierto proporciona protección contra *Pseudomonas aeruginosa*, que es un patógeno asociado con heridas por quemaduras.

30 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

35 [0168] Las cepas bacterianas utilizadas en este documento se enumeran en la Tabla 3.

TABLA 3: Cepas bacterianas utilizadas

Cepa	Genotipo pertinente	Origen
<i>E. coli</i> Nissle 1917	tipo salvaje	Mutaflor®
<i>E. coli</i> G1/2 ^a	tipo salvaje	Symbioflor 2®, SymbioPharm
<i>E. coli</i> G3/10 ^a	tipo salvaje	Symbioflor 2®, SymbioPharm
<i>E. coli</i> G4/9 ^a	tipo salvaje	Symbioflor 2®, SymbioPharm
<i>E. coli</i> G5 ^a	tipo salvaje	Symbioflor 2®, SymbioPharm
<i>E. coli</i> G6/7 ^a	tipo salvaje	Symbioflor 2®, SymbioPharm
<i>E. coli</i> G8 ^a	tipo salvaje	Symbioflor 2®, SymbioPharm
<i>E. coli</i> MDS42	cepa de delección múltiple K-12	Posfai, G., G. Plunkett III; T. Feher, D. Frisch, G.M. Keil; K. Umenhoffer, V. Kolisnychenko, B. Stahl, S.S. Sharma, M. de Arruda, V. Burland, S.W. Harcum, y F.R. Blattner 2006. Emergente Properties of Reduced-Genome <i>Escherichia coli</i> . <i>Science</i> 312: 1044-1046
EPEC E2348/69 O127:H6	Amp ^r (pUC19), Kana ^r (pUC4K) o Cm ^r (pACYC184)	Donnenberg, M.S. y Kaper, J.B. 1992. Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> . <i>Infect. Immun.</i> 60: 3953-3961.
EHEC 86-24 O157:H7	<i>stx2</i> , <i>eaeA</i> , EHEC- <i>hlyA</i> , <i>astA</i> , Sm ^r	Griffin, P.M., S.M. Ostroff, R.V. Tauxe, K.D. Greene, J.G. Wells, J.H. Lewis, y P.A. Blake. 1988. Illnesses associated with <i>Escherichia coli</i> O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. <i>Ann. Intern. Med.</i> 109: 705-712.
EHEC O104:H4	tipo salvaje, <i>stx2</i> , ESBL (<i>ctxM</i>)	aislado humano, Dresden

EHEC O104:H4	tipo salvaje, <i>stx2</i> , ESBL (<i>ctxM</i>)	aislado humano, Frankfurt (Oder)
EHEC O128:H2	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , EHEC- <i>hlyA</i> , Amp ^r (pUC4K)	aislado humano, Frankfurt (Oder)
^a DSM17252		

Ejemplo 2: Identificación de un grupo de genes que codifican microcina en *E. coli* G3/10

5 [0169] Se secuenciaron los genomas de seis *E. coli*: *E. coli* G1/2, G3/10, G4/9, G5, G6/7 y G-8. La anotación no
 10 reveló microcina conocida en el genoma de la *E. coli* G3/10. *E. coli* G3/10 contiene un gran plásmido conjugativo
 pSYM1 (Figura 1) con un tamaño de 50,6 kb. El plásmido es un 99% idéntico al plásmido pMAS2027 de un aislados
 de *E. coli* uropatógeno. Además, contiene un fragmento de inserción de 10 kb, pero el análisis BLAST reveló sólo los
 genes no caracterizados y sin nombre. Para identificar el origen de la acción bactericida se intentó curar la cepa de
 15 *E. coli* G3/10 a partir de su megaplásmido pSYM1. A pesar de la realización de muchos de los procedimientos de
 curado comunes, por ejemplo mitomicina C o tratamiento con calor, la cepa no se pudo curar. Por lo tanto, el
 plásmido pSYM1 se transfirió a *E. coli* G4/9 por conjugación. Para permitir un cribado de conjugantes, en primer
 lugar, se integró un casete de resistencia a la ampicilina en pSYM1 dando lugar a pSYM1-ST76An. El *E. coli* G4/9
 pSYM1-ST76An resultante fue capaz de inhibir la adhesión a EPEC significativamente (Figura 3). Se concluyó que el
 20 plásmido pSYM1 lleva genes que son responsables para el efecto mostrado. Un fragmento de 4,7 pb del plásmido
 pSYM1 se clonó en pBR322 dando como resultado el plásmido pAZ6, que a continuación se transformó en *E. coli*
 G4/9. El pAZ6 permite *E. coli* G4/9 inhibir la eficacia de adhesión de EPEC significativamente (Figura 3), indicando
 que el fragmento de 4,7 kb de pSYM1 es responsable del efecto de inhibición de la adhesión a EPEC de *E. coli*/
 G3/10 (Figura 2). El análisis BLAST de los marcos de lectura abiertos (ORF) anotados automáticamente reveló
 25 pequeñas homologías con proteínas o familias de proteínas caracterizadas, lo que indica una relación con operones
 que codifican microcina s. Sin embargo, la propia microcina no se detectó. Tres genes, llamados *mcsI*, *mcsA* y *mcsB*,
 se clonaron en pBR322 dando lugar a pAZ8. Se clonaron pequeños ORFs en dirección 5' de este operón (Figura 2),
 que son posibles genes que codifican microcina, en pACYC184 y se subclonaron en *E. coli* G4/9 pAZ8. Con esta
 etapa, se facilitó la codificación separada del plásmido de la probable microcina y proteínas auxiliares de la
 30 microcina. Sólo los plásmidos pAZ8 y pAZ9 que contenían *E. coli* G4/9 inhibieron significativamente la adhesión a
 EPEC, mientras que G4/9 pAZ8 afecta a la adhesión a EPEC de forma similar a G4/9 de tipo salvaje (Figura 3). El
 gen pequeño, denominado *mcsS*, codifica una microcina, que se denominó microcina S.

Ejemplo 3: Caracterización funcional de la microcina S y elucidación de su autoinmunidad

30 [0170] La adhesión bacteriana es una primera etapa crucial de muchas enfermedades infecciosas. Por lo tanto, un
 sistema de prueba que cuantifica la inhibición de la adhesión a células epiteliales intestinales humanas es adecuado
 para demostrar un efecto beneficioso para el huésped. En un primer experimento, se preincubaron monocapas
 confluentes de células CACO-2 o LOVO con cepas de prueba bacterianas EcN, *E. coli* G3/10, *E. coli* G4/9 o *E. coli*
 35 G4/9 pAZ6 a una MOI de 100:1 de *E. coli* con respecto a las células huésped. Después de dos horas de incubación,
 las células se lavaron y se infectaron con EPEC E2348/69 usando una MOI de 100:1 de EPEC con respecto a las
 células huésped. *E. coli* G3/10 y *E. coli* G4/9 pAZ6 fueron capaces de inhibir la adhesión de EPEC de forma similar a
 EcN. La inhibición de adhesión a EcN mostró ser dependiente de la actividad de las microcinas en las cepas. La
 40 eficacia de la adhesión en % se expresa como la adhesión de EPEC en relación con la adhesión sin ninguna
 preincubación (control negativo), que se fija al 100%. Los datos son la media \pm SD de al menos tres experimentos
 separados en pocillos duplicados. La figura 4 muestra la eficacia de adhesión de la EPEC E2348/69 de tipo salvaje y
 mutantes complementados con plásmido que llevan *mcsI* a las células epiteliales intestinales humanas después de
 la preincubación con diferentes cepas que expresan microcina (*E. coli* G3/10, G4/9 pAZ6 y ECN) y que no expresan
 45 microcina (*E. coli* G4/9). Como resultado, *mcsI* podría identificarse, sin duda, como el gen de autoinmunidad de la
 microcina S.

Ejemplo 4: Impacto sobre *E. coli* enterohemorrágica

50 [0171] La *E. coli* enterohemorrágica se adhiere a células epiteliales intestinales. En un segundo experimento, las
 monocapas confluentes de células LOVO se preincubaron con cepas de prueba de bacterias a una multiplicidad de
 infección (MOI) de 100:1 de *E. coli* con respecto a las células huésped. Se probó la influencia de EcN y *E. coli*
 G3/10. Después de dos horas de incubación, las células se lavaron y se infectaron con EHEC utilizando una MOI de
 100:1 de EHEC con respecto a las células huésped. Se probaron tres aislados de EHEC como cepas indicadoras
 55 utilizando el ensayo de adhesión in vitro. Se utilizó EHEC 86-24 serotipo O157:H7 asociada a HUS y dos aislados
 diferentes de la cepa del brote EHEC O104:H4, así como un aislado del paciente EHEC O128:H2. Dado que los
 aislados de EHEC O104:H4 son productores de ESBL, el tratamiento médico es limitado. La eficacia en la adhesión
 en % se expresa como la adhesión de EHEC en relación con la adhesión sin ninguna preincubación (control
 negativo), que se fija al 100%. Los datos son la media \pm SD de tres experimentos independientes en pocillos
 60 duplicados. La adhesión de EHEC solamente fue inhibido por *E. coli* G3/10, lo que indica un mecanismo de acción
 diferente de MccM/H47 de EcN y MccS de *E. coli* G3/10. La figura 5 muestra la eficacia de adhesión de las cepas de
 EHEC 86-24 serotipo O157:H7 (A), EHEC O104:H4 aislada en Dresden (B) y EHEC O104:H4 (C) y O128:H2 (D)
 aisladas en Frankfurt (Oder) en células epiteliales intestinales humanas después de la preincubación con EcN o *E.*

coli G3/10.

Ejemplo 5: Cribado del gen de microcina S *mccS* en diversos *E. coli* y otras enterobacterias

5 **[0172]** La secuencia de la microcina S es desconocida en las bases de datos de nucleótidos y aminoácidos. El
cribado del conjunto de genes *MccS* se realizó en 38 cepas de *E. coli*, 2 de *Shigella* y 2 de *Salmonella* usando PCR
multiplex y el gen *recA* como control de inhibición. Las cepas probadas son las cepas comunes de laboratorio,
aislados de muestras clínicas humanas y aislados de muestras veterinarias de diferente origen. El gen *McsS* no se
10 pudo detectar en ninguno de los 42 aislados de muestras humana y veterinaria probados, ni en las cepas de
laboratorio. Los resultados se representan en la Figura 6.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Technische Universität Dresden and Symbio Gruppe GmbH & Co KG Gunzer,
Florian

<120> MICROCINA S. FORMADA BACTERIALMENTE, UN NUEVO PÉPTIDO ANTIMICROBIANO,
EFICAZ CONTRA MICROORGANISMOS PATOGENICOS, POR EJEMPLO, EHEC

20 <130> P31501-WO

<140> 2011-08-12

<141> EP 11 177 451.9

25 <160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

30 <211> 4679

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 1

35	ttaatTTTTg ttcagcccat catcaatggt gcgcttgtgc ctcagctcca taaagcagcc	60
	gtctgccaga tacagaacct ggtctgcaga ggctatggtt tccgggcat gggctatcag	120
	caggacagga agccccagct gacgtagtgt ctggcttattc tgaatttcac tttcaacatc	180
40	aagatggctg gtcgcttcat ccagtaataa aaatcccggg ttcttgtaca aagccctggc	240
	cagcagaatg cgttgttttt gccctccgga aagccctcca ccggtttcac caatcagcgt	300
45	ctgatacccc atcggcatag acatgatatc gctgtcgata agtgccagtc tggcgcactg	360
	gatcattcgt tcatgattgc ggtctccact gaaaaaaatg atgttatctg caatggagcc	420
	cctgaaaaga tggatcatcct gcagtacggg accgattcgc tgacgtacct gaaaataatc	480
50	cgggtgggta tgcggtatgc caaatgccct gattgttccc tcatccggga tgtggatccc	540
	caggataagc ttcaccagtg tcgattttccc gcatccggat tgaccggtaa tggccatcac	600
55	ctcgccagga tggagtgtca gcgacacccc gcggagtatc ggtttattcc ctcccttgtg	660
	gctgaagggtt atatgctcaa gggataaagg aacacgggca ccgtcggcca catccccccg	720
	gaatacggac gggaagacag aagtatcatt gtcttcctga gcgggttggt gctgatagtc	780
60	ttctgtcggg gtcagcaca tgtcagccag gcgttcggtg tagatatcaa gcatacgcca	840
	ggaaaaatac ttatcgggtca ggctgtgat actggatgaa aaacgcatct ggtaggacaa	900
65	ataagcaacc agcatgccga cgggtgaagg accggtcagt acttccccgg cacctttcca	960
	caaaataatc gctgatacca cgctgccggg cagggtgtgt gcaatgtcat agcacatcag	1020

ES 2 620 529 T3

	ctgacggctc	tgctgcagct	gcgtattcct	gcgaacaatg	ttgaggttca	gccaggcggc	1080
	ctcacggtgc	gctgtcacgc	cgtaaattct	caggctcaga	ataccgttga	gggtttcaag	1140
5	aaaatgcccg	gactccctgg	cacctgcgtc	ccaggcatct	tctgccgact	gtcgaagggg	1200
	cggataccac	aacgccctca	gcacaccgta	gataatggct	gccagtacgg	ctatcagcgt	1260
10	catttccgga	ctgtacagca	gcatcataca	gagcgcagtt	atcacgagca	acacgtccag	1320
	aataccttcc	agtacctgcg	tggtcagcgc	ctcctggatg	gtatccacgg	cctcaaaacg	1380
	ggcattgata	cttcccttac	tgcgcgcatac	aaaccagccc	agcgggagac	gcaccagatg	1440
15	atggaaaacc	cgggctgtcc	actgcatggt	aaaattgacg	gacagagtta	tactggccca	1500
	ctggcgtgcc	agcgacagca	gcatctgggt	cattgacagc	agcagcaggg	caatgattat	1560
20	aacggctcagg	agacttcgat	cggcggcaac	cagcacttca	tcaattacca	gctggttgag	1620
	aagtggacta	ctcagcgtca	ggatttccag	cgccagggca	aaaatgatga	tgcgcgacat	1680
	cgcgccagc	agcccgggtg	tcctgcctgt	cagttggcgc	aggcgaattt	tttttctttc	1740
25	atcccgggcg	gtaaaatcac	tggccggcgt	caactccagc	gcgacaccgg	tgaaatgttt	1800
	tcctgcatcc	tgcagggaga	gcgttatctt	ccctttgtcc	gggtcgtgga	taaccagcct	1860
30	gctcccgcga	actttataaa	gcacgacgaa	atggttcatg	ttccagtgga	gaatgcacgg	1920
	gagagaaagg	gatttcaggt	cttccggctc	cagccggacg	gcccgggagg	acaaccggat	1980
	accggctgca	cactctatca	gcctctgcag	ggtcatcccc	tgtgtgctga	tactgaaacg	2040
35	ttcgcgcagg	gtgggtaaat	ctgtctgcag	accatgccag	caggccatca	tgaccagaca	2100
	tgccagacca	cattccgcag	actctgtctg	ccggatgagg	gggagctggt	ttctcccggg	2160
40	ccatttaagg	gtatccatta	cagttttcct	ttcaggctcc	agagtggctc	ggtcagccac	2220
	tcccacaaat	ggcgggtatc	caggctgaca	tcccctcaa	gggtcatgcc	ggggcgcagg	2280
	ggttcctggt	ttccataagc	cagaatgaag	gtattctcag	gttcgacgat	gacgcggtag	2340
45	tgcccttcat	tctctttcca	ggtcacaggg	gatacggaga	gtaaattccga	aggggtcagc	2400
	gttgtacggc	ttatctctcg	gatagtcccg	tactgaacgc	caacttctg	ataggggaat	2460
50	gcggcgaacc	gaagtgcaac	acgtgcccc	ggctgaataa	aaccggcatt	ctgactggtg	2520
	gcatagagtt	ctatctgcag	acgagcattg	tcgggaacca	gagtcatgac	cggttcagat	2580
	gccctgacag	actgtccctg	tctgatcagc	acggcagcaa	cggttccgga	taccggtgac	2640
55	gtcagcgtaa	agttctcctg	tccggccagt	tcgtcctgct	gttgcctgat	cccctgcaac	2700
	tgctgtcca	gctcagcttt	acggctttcc	ccctgaacga	tgagatggtt	aagatcttct	2760
60	tcagcagcct	ccattgcagt	gtgtagttgc	agaagcccct	gacgctgatc	ctcaacgttt	2820
	tgcagtgcag	tagaaacgtc	aatttgcttc	tgctggtatt	cgatatctga	tacgtaatgc	2880
	gttccagcca	gttttttata	gcgctccatg	acggacacgg	ccagcgtggc	ctgatgcccg	2940
65	gcaagcgaca	ggcgcagctc	tgcactttta	atctgtgggt	tcagggaggc	aattcgctgt	3000
	agtatggcct	gctgctgctg	actgttgtca	cgcaattcca	gagtctgctg	ggaagacagc	3060

ES 2 620 529 T3

	atggcatact	gagtcttcag	ggacatgctc	atggctgcca	gtgtacctgt	gccctgcccc	3120
	ttgtaatgct	cgccgctgat	atggtaaaca	ggctcaccgg	cagctacgtg	ctgaccttct	3180
5	gaaacagtct	gtcgggtgac	gtatccggca	tattgcggtg	tgattttcac	cagtcctgat	3240
	gaaggcatca	ctatacctgt	aagatgagcc	ttgcgggtat	aactaccata	ataaacgaat	3300
10	aatgagacgc	tcagaaatat	aagtaatgta	gcaacggcgc	atactgacat	gccaaatgac	3360
	gcgggtaaga	caatatctcc	gtactctgta	tactgttat	gttctaatagc	ttcctccctg	3420
	aatatactca	tggttataaa	atattttgaa	tatttaataa	tataacaaag	gtattcatgc	3480
15	ctgaatgtat	taacatagga	taaaaaagg	atctgctttt	aattctgacc	cctaataaca	3540
	gcatagatac	aacaaaaagg	actgattgat	ccagaacatt	ataaactga	aagtgcacatca	3600
20	gagagaaaaa	caaagatggt	atcacacagg	gaatgataat	gttttccttg	aaaattgaac	3660
	gcagaaatcc	aaaggcacag	gctctgtata	cgatctcctc	atagtagggg	acgaccagtg	3720
	tcatcactaa	aactgttatc	cagtttatct	gtgatggttc	gtaatgatat	aaatagtctc	3780
25	tgtagcagta	aacagctaac	tgtatcagaa	taattataag	gaatgacagg	gctgaaaatt	3840
	taactgtagc	tgagtctggt	cttattttta	ttctacactc	aggaaattcc	tttaggtaaa	3900
30	ataagtaaac	aagagttgaa	attagaatct	ctgtaatgaa	cacaatgaaa	aatgcaatat	3960
	ccagtccaac	ataacgcagt	gtaaagggtg	gcgataatgt	tacaatagtt	gatataataa	4020
	ccactgcaag	aaaaataata	gcgctgtatt	tactatatct	aaactggctc	gaacgttcat	4080
35	ccattacaaa	acatcacttt	atgaaggtta	ttatttttgc	taaaactata	tctgtaaatt	4140
	tagcagtgga	aaacaagggtg	atcaatgtaa	ttactatfff	tgaaaattcc	tcaggcaacg	4200
40	aaaaccatga	caaatcaata	atggaggaac	cacttaatag	cgcaaaacc	agtaataaac	4260
	ttaatataaa	agacaataat	ttaataaaca	ctgcagtatc	ctccgttgat	acttacttat	4320
	cgactacagg	taccaccgac	gttacttcct	gaacaattac	tggaaccagc	tctgtttccg	4380
45	cctccgttac	catttctctc	accggagaga	cactggccga	taactgcccc	accaatagtt	4440
	cctctggtca	ttcctacagg	accaccttta	atggcaccac	caaccattcc	actaaagaca	4500
50	gcattagcac	atttaactgt	gctcgggtca	ctgtaaatgt	gtgtcgggtg	atttcgtccc	4560
	agtgagttac	gggctccggt	gttacgacta	cgacttccgc	ctccttcata	attactgttt	4620
	gcgttgccac	cactgactaa	tgcaatttca	tcaaaactca	attctctgat	atttgacat	4679
55	<210>	2					
	<211>	363					
	<212>	ADN					
	<213>	Escherichia coli					
60	<400>	2					
	atgtcaaata	tcagagaatt	gagttttgat	gaaattgcat	tagtcagtgg	tggcaacgca	60
65	aacagtaatt	atgaaggagg	cggaagtcgt	agtcgtaaca	ccggagcccc	taactcactg	120
	ggacgaaatg	caccgacaca	catttacagt	gacccgagca	cagttaaagt	tgctaatagct	180
	gtcttttagtg	gaatggttgg	tggtgccatt	aaagggtggtc	ctgtaggaat	gaccagagga	240

ES 2 620 529 T3

	actattggtg gggcagttat cggccagtgt ctctccggtg gaggaaatgg taacggaggc	300
5	ggaaacagag ctggttccag taattgttca ggaagtaacg tcggtggtac ctgtagtcga	360
	taa	363
10	<210> 3 <211> 651 <212> ADN <213> Escherichia coli	
15	<400> 3 atggatgaac gttcagacca gtttagatat agtaaataca gcgctattat ttttcttgca	60
	gtggttatta tatcaactat tgtaacatta tcgccaacct ttacactgcg ttatgttgga	120
20	ctggatattg catttttcat tgtgttcatt acagagattc taatttcaac tcttgtttac	180
	ttattttacc taaaggaatt tcctgagtgt agaataaaaa taagaacaga ctacagctaca	240
	gttaaatttt cagccctgct attccttata attattctga tacagttagc tgtttactgc	300
25	tacagagact atttatatca ttacgaacca tcacagataa actggataac agtttttagtg	360
	atgacactgg tcgtacccta ctatgaggag atcgtataca gagcctgtgc ctttggattt	420
30	ctgcgttcaa ttttcaagga aacattatc attccctgtg tgataacatc tttgttttct	480
	tctctgatgc actttcagta ttataatggt ctggatcaat cagtcctttt tgttgatct	540
	atgctgttat taggggtcag aattaaagc agatcccttt tttatcctat gtaatacat	600
35	tcaggcatga atacctttgt tatattatta aatattcaaa atattttata a	651
40	<210> 4 <211> 1254 <212> ADN <213> Escherichia coli	
45	<400> 4 atgagtatat tcagggagga agcattagaa cataacagtg atacagagta cggagatatt	60
	gtcttaccg cgtcatttgg catgtcagta tgcgccgttg ctacattact tatatttctg	120
	agcgttcat tattcgttta ttatggtagt tatacccgca aggctcatct tacaggtata	180
50	gtgatgcctt catcaggact ggtgaaaatc acaccgcaat atgccgata cgtcaccgca	240
	cagactgttt cagaagggtca gcacgtagct gccggtgagc ctgtttacca tatcagcggc	300
55	gagcattaca acgggcaggg cacaggtaca ctggcagcca tgagcatgtc cctgaagact	360
	cagtatgcca tgctgtcttc ccagcagact ctggaattgc gtgacaacag tcagcagcag	420
	caggccatac tacagcgaat tgcctccctg aaaccacaga ttaaaagtgc agagctgctc	480
60	ctgtcgcttg ccgggcatca ggccacgctg gccgtgtccg tcatggagcg ctataaaaaa	540
	ctggctggaa cgcattacgt atcagatatc gaataccagc agaagcaat tgacgtttct	600
65	acgtcactgc aaaacgttga ggatcagcgt caggggcttc tgcaactaca cactgcaatg	660
	gaggctgctg aagaagatct taaccatctc atcgttcagg gggaaagccg taaagctgag	720
	ctggacaggc agttgcaggg gatcaggcaa cagcaggacg aactggccgg acaggagaac	780

ES 2 620 529 T3

	tttacgctga	cgtcaccggt	atccggaacc	gttgctgccg	tgctgatcag	acagggacag	840
5	tctgtcaggg	catctgaacc	ggatcatgact	ctggttcccc	acaatgctcg	tctgcagata	900
	gaactctatg	ccaccagtca	gaatgccggt	tttattcagc	cggggcagcg	tgttgcactt	960
	cggttcgcg	cattccccta	tcagaagttt	ggcgttcagt	acgggactat	ccgagagata	1020
10	agccgtacaa	cgctgacccc	ttcggattta	ctctccgtat	cccctgtgac	ctggaaagag	1080
	aatgaagggc	actaccgctg	catcgtcgaa	cctgagaata	ccttcattct	ggcttatgga	1140
	aaacaggaac	ccttgcgccc	cggcatgacc	cttgaggggg	atgtcagcct	ggatacccgc	1200
15	catttgtggg	agtggtctgac	cgagccactc	tggagcctga	aaggaaaact	gtaa	1254
	<210>	5					
20	<211>	2178					
	<212>	ADN					
	<213>	Escherichia coli					
	<400>	5					
25	atggataccc	ttaaattggac	cgggagaaaa	cagctcccc	tcatccggca	gacagagtct	60
	gcggaatgtg	gtctggcatg	tctggatcatg	atggcctgct	ggcatggtct	gcagacagat	120
30	ttaccacccc	tgcgcgaaacg	tttcagtatc	agcacacagg	ggatgaccct	gcagaggctg	180
	atagagtgtg	cagccggtat	ccggttgctc	tcccggggccg	tccggctgga	gccggaagac	240
	ctgaaatccc	tttctctccc	gtgcattctc	caactggaaca	tgaaccattt	cgctgtgctt	300
35	tataaagttc	gcgggagcag	gctggttatc	cacgaccg	acaagggaa	gataacgctc	360
	tccctgcagg	atgcaggaaa	acatttcacc	gggtgcgcgc	tggagtgtgac	gccggccagt	420
40	gattttaccg	cccgggatga	aagaaaaaaa	attcgcctgc	gccaaactgac	aggcaggaca	480
	cccgggctgc	tggccgcgat	gtcgcgcac	atcatttttg	ccctggcgct	ggaaatcctg	540
	acgctgagta	gtccacttct	caaccagctg	gtaattgatg	aagtgtggtg	tgccgccgat	600
45	cgaagtctcc	tgaccgttat	aatcattgcc	ctgctgctgc	tgtcaatgac	ccagatgctg	660
	ctgtcgctgg	cacgccagtg	ggccagtata	actctgtccg	tcaattttaa	catgcagtgg	720
	acagcccggg	ttttccatca	tctgggtgctg	ctcccgtg	gctggtttga	tgcgcgagc	780
50	aagggaaagta	tcaatgccc	ttttgaggcc	gtggatacca	tccaggaggc	gctgaccacg	840
	caggtactgg	aaggtattct	ggacgtgttg	ctcgtgataa	ctgcgctctg	tatgatgctg	900
55	ctgtacagtc	cggaaatgac	gctgatagcc	gtactggcag	ccattatcta	cggtgtgctg	960
	agggcgttgt	ggtatccgctc	ccttcgacag	tcggcagaag	atgcctggga	cgcaggtgcc	1020
60	agggagtccg	ggcattttct	tgaaacctc	aacggattc	tgagcctgag	aattaacggc	1080
	gtgacagcgc	accgtgaggc	cgctggctg	aacctcaaca	ttgttcgcag	gaatacgcag	1140
	ctgacgacaga	gccgtcagct	gatgtgctat	gacattgcac	acaccctgac	cggcagcgtg	1200
65	gtatcagcga	ttattttgtg	gaaagggtgcc	ggggaagtac	tgaacggtac	cttcaccgctc	1260
	ggcatgctgg	ttgcttattt	gtcctaccag	atgcgttttt	catccagtat	cagcagcctg	1320

ES 2 620 529 T3

accgataagt atttttcctg gcgtatgctt gatatctaca acgaacgcct ggctgacatt 1380
 gtgctgaccc cgacagaaga ctatcagcaa caaccgctc aggaagacaa tgatacttct 1440
 5 gtcttcccgt ccgtattccg gggggatgtg gccgacggtg cccgtgttcc tttatccctt 1500
 gagcatataa cttcagcca caagggaggg aataaaccca tactccgcgg ggtgtcgctg 1560
 aactccatc ctggcgaggt gatggccatt accggtcaat ccggatgcgg gaaatcgaca 1620
 10 ctggtgaagc ttatcctggg gatccacatc ccggatgagg gaacaatcag ggcatttggc 1680
 ataccgcata cccaccgga ttatcttcag gtacgtcagc gaatcggtag cgtactgcag 1740
 gatgaccatc ttttcagggg ctccattgca gataacatca ttttttcag tggagaccgc 1800
 aatcatgaac gaatgatcca gtgcccaga ctggcactta tcgacagcga tatcatgtct 1860
 atgccgatgg ggtatcagac gctgattggt gaaaccggtg gagggctttc cggagggcaa 1920
 20 aaacaacgca ttctgctggc cagggctttg tacaagaaac cgggattttt attactggat 1980
 gaagcgacca gccatcttga tgttgaaagt gaaattcaga taagccagac actacgtcag 2040
 25 ctggggcttc ctgtcctgct gatagcccat cgcccggaaa ccatagcctc tgcagaccgg 2100
 gttctgtatc tggcagacgg ctgctttatg gagctgaggc acaagcgcac cattgatgat 2160
 gggctgaaca aaaattaa 2178

<210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 35 <213> Escherichia coli
 <400> 6

Met Ser Asn Ile Arg Glu Leu Ser Phe Asp Glu Ile Ala Leu Val Ser
 40 1 5 10 15
 Gly Gly Asn Ala Asn Ser Asn Tyr Glu Gly Gly Gly Ser Arg Ser Arg
 45 20 25 30
 Asn Thr Gly Ala Arg Asn Ser Leu Gly Arg Asn Ala Pro Thr His Ile
 50 35 40 45
 Tyr Ser Asp Pro Ser Thr Val Lys Cys Ala Asn Ala Val Phe Ser Gly
 55 50 55 60
 Met Val Gly Gly Ala Ile Lys Gly Gly Pro Val Gly Met Thr Arg Gly
 60 65 70 75 80
 Thr Ile Gly Gly Ala Val Ile Gly Gln Cys Leu Ser Gly Gly Gly Asn
 65 85 90 95
 Gly Asn Gly Gly Gly Asn Arg Ala Gly Ser Ser Asn Cys Ser Gly Ser
 100 105 110
 Asn Val Gly Gly Thr Cys Ser Arg
 115 120

ES 2 620 529 T3

5 <210> 7
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 7

10 Asn Ala Asn Ser Asn Tyr Glu Gly Gly Gly Ser Arg Ser Arg Asn Thr
 1 5 10 15

15 Gly Ala Arg Asn Ser Leu Gly Arg Asn Ala Pro Thr His Ile Tyr Ser
 20 25 30

20 Asp Pro Ser Thr Val Lys Cys Ala Asn Ala Val Phe Ser Gly Met Val
 35 40 45

25 Gly Gly Ala Ile Lys Gly Gly Pro Val Gly Met Thr Arg Gly Thr Ile
 50 55 60

30 Gly Gly Ala Val Ile Gly Gln Cys Leu Ser Gly Gly Gly Asn Gly Asn
 65 70 75 80

35 Gly Gly Thr Cys Ser Arg
 100

40 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador de secuenciación pSYM1
 <400> 8
 cagctggata tcctgcgcg 19

50 <210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador de secuenciación pSYM1

60 <400> 9
 ggttgcccgg catccaacg 19

65 <210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador de clonación pAZ6/pAZ8

	<400> 10 tcaattgtgt cgactcaatt actcttgtga g	31
5	<210> 11 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de clonación pAZ6	
15	<400> 11 catgtaatag tgctagcatg ttaaaattta taag	34
20	<210> 12 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador de clonación pAZ8, pAZ12	
	<400> 12 caaaaataat agctagcaag tgatgttttg taatg	35
30	<210> 13 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador de clonación pAZ9	
40	<400> 13 ctcgaattca tccattacaa aacatcac	28
45	<210> 14 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de clonación pAZ9	
50	<400> 14 ctggctgcag taattgttca ggaagtaacg	30
55	<210> 15 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador de clonación pAZ10	
	<400> 15 taggaattca gaggaactat tgggtggg	27
65	<210> 16 <211> 37 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador de clonación pAZ10	
	<400> 16	
	ctccgctgca gacttactta tcgactacag gtaccac	37
10	<210> 17	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador de clonación pAZ11	
	<400> 17	
20	gttagaattc ataagagga tttttatgtc aaatattc	37
	<210> 18	
	<211> 35	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de clonación pAZ11	
30	<400> 18	
	gttgatactg cagcttatcg actacaggta ccacc	35
	<210> 19	
35	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador de clonación pAZ12	
	<400> 19	
	cccaagctta gttaaattgtg ctaatgctgt c	31
45	<210> 20	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador de clonación pAZ12	
	<400> 20	
55	ggcatcggtc gacgcaac	18
	<210> 21	
	<211> 32	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de clonación pAZ14	
65	<400> 21	
	cattgctagc catcacagat aaactggata ac	32

5	<210> 22 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador de clonación pAZ13, pAZ14	
10	<400> 22 ccctgagtcg actcatgggt ataaaatatt ttg	33
15	<210> 23 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Control de inhibición	
	<400> 23 atggctatcg acgaaaacaa ac	22
25	<210> 24 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Control de inhibición	
35	<400> 24 ttaaaaatct tcgtagttt ctgc	24
40	<210> 25 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador de cribado de mcSS	
	<400> 25 atgtcaaata tcagagaatt gag	23
50	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador de cribado de mcSS	
	<400> 26 ttatcgacta caggtaccac c	21
60		

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad antimicrobiana, en el que el polipéptido
- 5 a) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 o de SEQ ID No: 7;
- b) está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70% o más idéntica a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID Nos: 1 ó 2, o un complemento de la misma; o
- 10 c) está codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID Nos: 1 ó 2, o un complemento de la misma, en condiciones rigurosas.
2. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido microcina S con actividad antimicrobiana, en la que dicha molécula de ácido nucleico
- 15 a) comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70% o más idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 ó 2, o un complemento de la misma;
- b) comprende una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 o 2, o un complemento de la misma, en condiciones rigurosas; o
- 20 c) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 6 o de la SEQ ID No: 7.
3. Plásmido que comprende la molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 2, o que codifica un polipéptido, según la reivindicación 1.
- 25 4. Procedimiento para obtener una célula que comprende la molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 2, y/o el polipéptido, según la reivindicación 1, y/o el plásmido, según la reivindicación 3, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 30 i) introducir en una célula la molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 2 y/o el plásmido, según la reivindicación 3,
- ii) y opcionalmente cultivar la célula en condiciones que permiten la expresión del polipéptido a partir de dicha molécula de ácido nucleico o dicho plásmido.
- 35 5. Anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido, según la reivindicación 1.
6. Composición que comprende
- a) el polipéptido según la reivindicación 1.
- 40 7. Composición, según la reivindicación 6, en la que la composición es una composición farmacéutica que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable o en la que la composición es un desinfectante para superficies.
8. Polipéptido, según la reivindicación 1, o la composición, según la reivindicación 6, para utilizar en terapia o prevención.
- 45 9. Polipéptido, según la reivindicación 1, o la composición, según la reivindicación 6, para utilizar en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas.
- 50 10. Polipéptido para utilizar, según la reivindicación 9, comprendiendo la infección microbiana infecciones con *E. coli* enteropatógena y/o enterohemorrágica (EPEC, EHEC) o infecciones bacterianas asociadas con el síndrome urémico hemolítico (HUS).
11. Polipéptido, según la reivindicación 1, o la composición, según la reivindicación 6, para utilizar en el tratamiento o prevención de trastornos gastrointestinales o trastornos gastrointestinales funcionales o para utilizar en el tratamiento de un tumor.
- 55 12. Procedimiento para producir el polipéptido, según la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 60 i) introducir en una célula la molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 2 y/o el plásmido, según la reivindicación 3,
- ii) y cultivar la célula en condiciones que permiten la expresión del polipéptido a partir de dicha molécula de ácido nucleico o dicho plásmido, o sintetizar el polipéptido, según la reivindicación 1, por medio de técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase en solución.
- 65 13. Procedimiento *in vitro* para la identificación de bacterias que son sensibles a microcina S, comprendiendo el

procedimiento poner en contacto el polipéptido, según la reivindicación 1, o el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 2, o la composición, según la reivindicación 6, con una célula, en el que la reducción de la eficacia de adhesión de la célula a células epiteliales intestinales es indicativa de la sensibilidad de la célula a microcina S.

5

14. Procedimiento para conservar alimentos, comprendiendo el procedimiento:
añadir a los alimentos al menos un tipo de un agente antimicrobiano natural, en el que el agente es
a) el polipéptido, según la reivindicación 1; y/o
b) la composición, según la reivindicación 6.

10

15. Procedimiento para recubrir material de apósito, en el que el material de apósito está recubierto con:
a) el polipéptido, según la reivindicación 1; y/o
b) la composición, según la reivindicación 6.

Figura 1

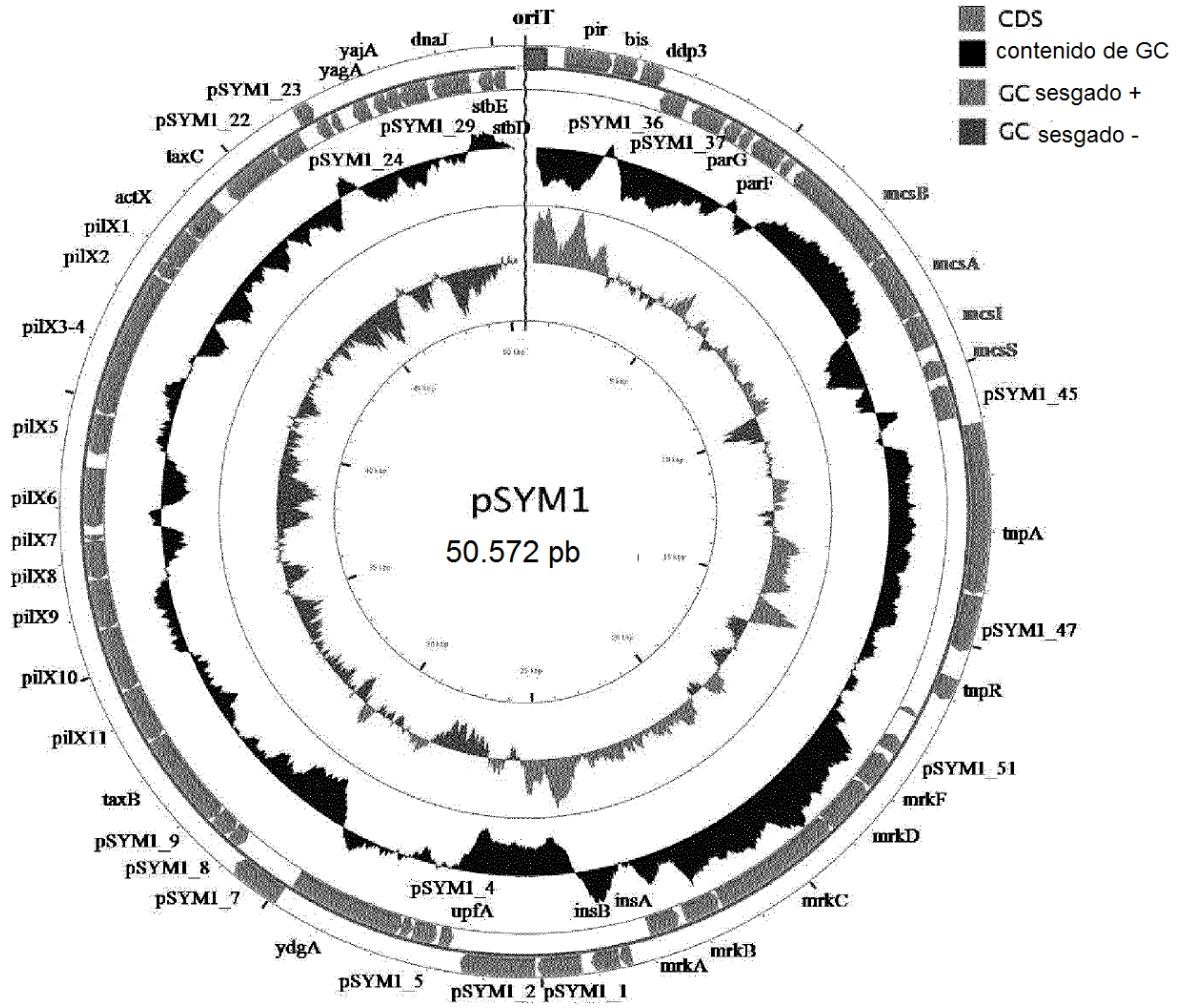


Figura 2

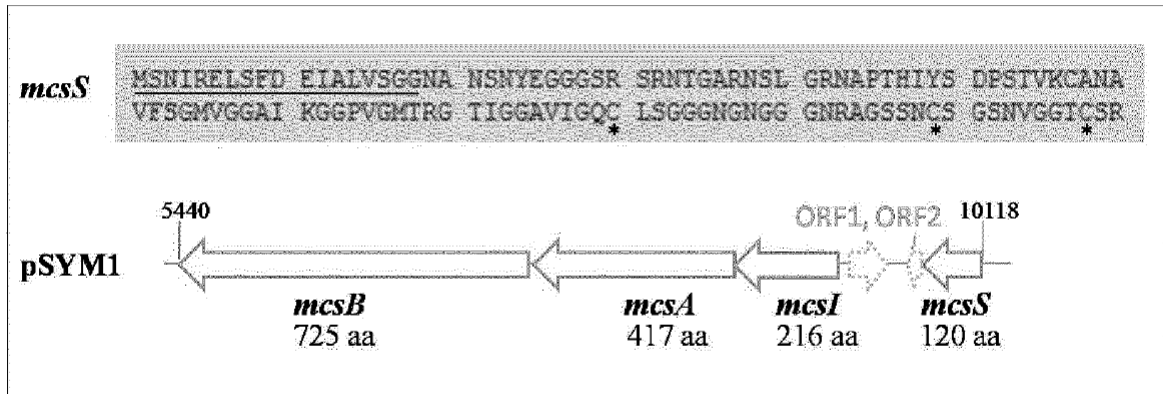


Figura 3

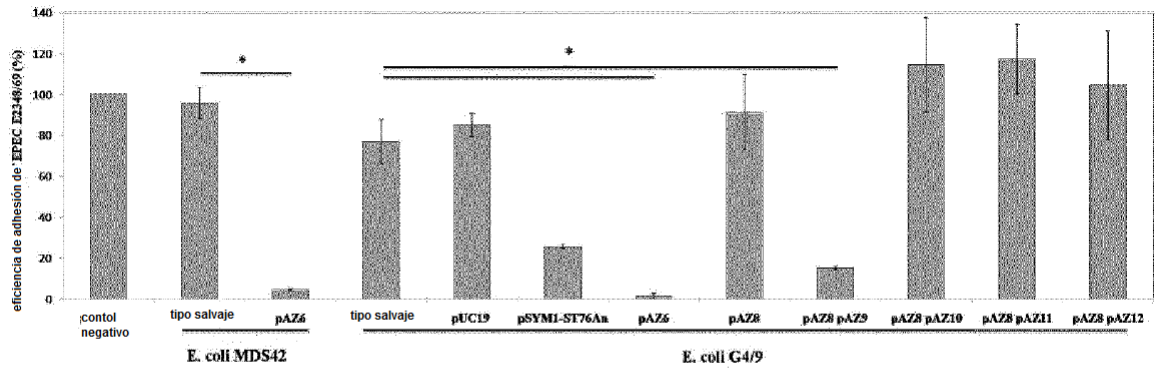


Figura 4

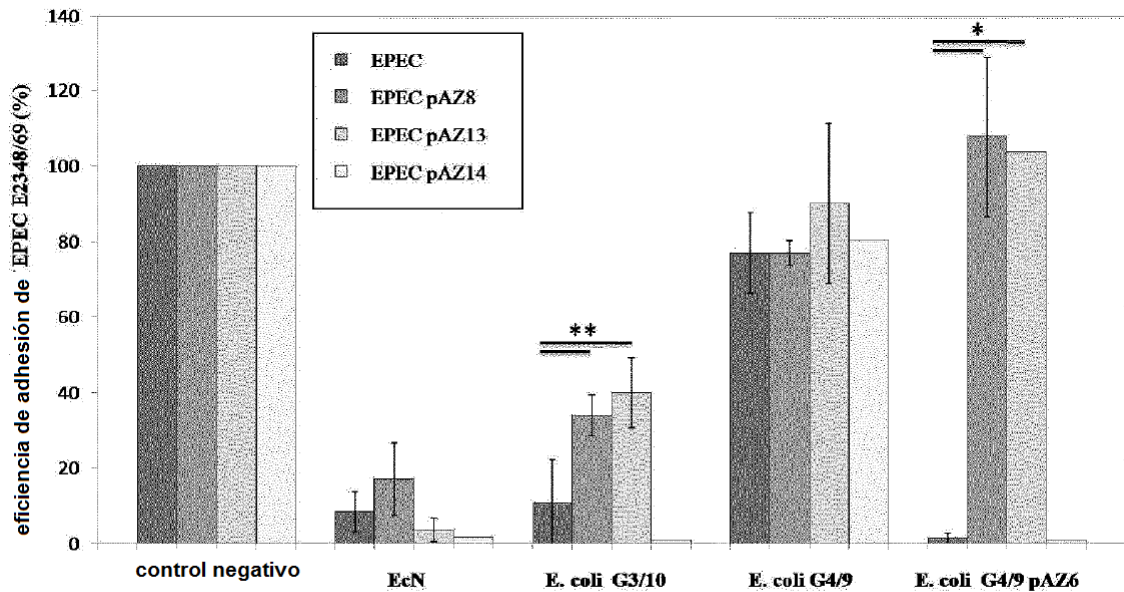


Figura 5

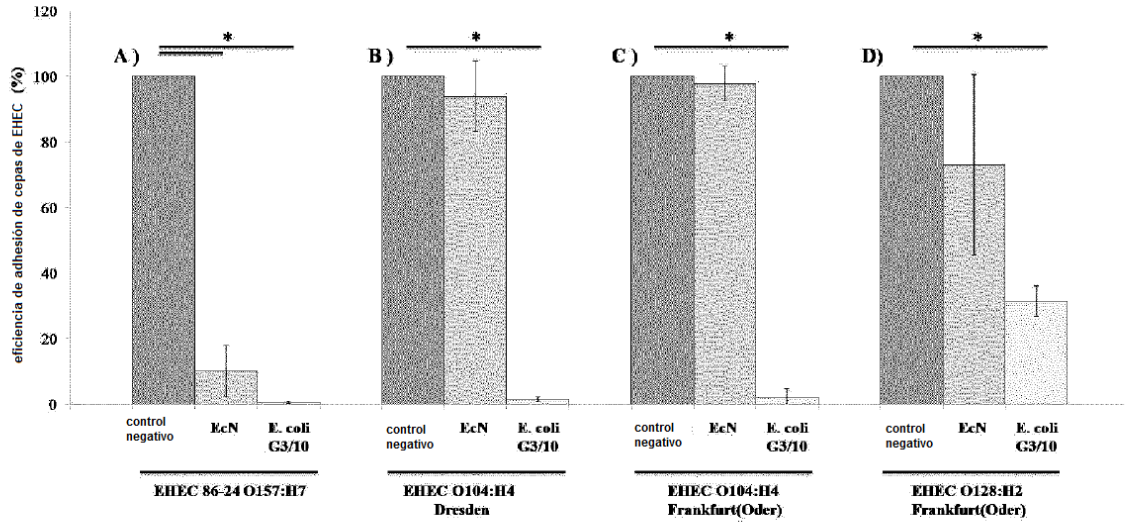


Figura 6

