



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 302 945**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
C07K 14/485 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03760706 .6**
86 Fecha de presentación : **19.06.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1513545**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2005**

54 Título: **Métodos y medios para fomentar la absorción intestinal.**

30 Prioridad: **19.06.2002 EP 02077532**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008

73 Titular/es: **Actogenix N.V.**
Technologiepark 4
9052 Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es: **Steidler, Lothar**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 302 945 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

Métodos y medios para fomentar la absorción intestinal.

5 La presente invención se refiere a bacterias del ácido láctico que producen factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su uso para aumentar la altura de las vellosidades intestinales y para fomentar la absorción intestinal. En particular, la invención se refiere a *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei* que producen EGF. Dichos organismos pueden ser especialmente útiles para tratar el síndrome del intestino corto.

10 La eficacia de la absorción intestinal es esencial para una buena conversión de los alimentos. La absorción intestinal está muy determinada por la superficie del intestino, que es función, entre otros, de la longitud del intestino y de la altura de las vellosidades. En casos donde es necesaria la eliminación quirúrgica de parte del intestino, como en el caso del cáncer o la enfermedad de Crohn, esto puede producir un descenso en la absorción intestinal, que da como resultado una conversión de los alimentos insuficiente y una insuficiencia de nutrientes, deshidratación e incluso cambios metabólicos potencialmente letales. Estos síndromes producidos por la resección extensa del intestino delgado se conocen como síndrome del intestino corto. Se han propuesto varios métodos para mejorar las adaptaciones posoperatorias de y aumentar la absorción intestinal en pacientes con el síndrome del intestino corto. US5288703 divulga que tanto la hormona del crecimiento como el factor de crecimiento semejante a insulina tienen un efecto positivo sobre la absorción intestinal en mamíferos. Este efecto positivo se puede aumentar mediante la administración de glutamina o un equivalente de glutamina. La administración de glutamina y hormona del crecimiento da como resultado un aumento la longitud de las vellosidades (Gu *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). US5972887 demostró una recuperación de la masa mucosa intestinal reducida y la función absorbente en pacientes mediante la administración de dosis bajas de factor de crecimiento de hepatocitos exógeno. También se han usado los péptido semejantes a glucagón GLP-1 y GLP-2 con resultados positivos. Estudios con animales de laboratorio (Scott *et al.*, 1998) así como con humanos (Jeppesen *et al.*, 2001) mostraron una correlación positiva entre el aumento de la concentración de GLP-2 y una mejora en la adaptación intestinal. Los pacientes de intestino corto, a los cuales se les ha eliminado el íleon muestran un descenso en la secreción de GLP-2 inducida por alimentos (Jeppesen *et al.*, 1999). Especialmente esos pacientes pueden ser tratados con éxito con GLP-2. Se ha mostrado que también la leptina tiene un efecto positivo sobre la adaptación intestinal en un modelo de rata (Pearson *et al.*, 2001).

30 Se ha puesto mucho interés en el efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF, urogastrona). El EGF es una hormona relativamente estable al ácido que se produce en las glándulas salivares y de Brunner. Se encuentra en una gran variedad de secreciones externas así como en la sangre y líquido amniótico (Marti *et al.*, 1989). El peso molecular del EGF humano maduro es de 6,2 kDa (Carpenter *et al.*, 1991). El EGF está filogenéticamente muy conservado y se produce mucha reactividad cruzada entre diferentes especies.

35 Se sabe que el EGF aumenta la absorción de H₂O, Na⁺, Cl⁻ y glucosa en un modelo de conejo (Opleta-Madsen *et al.*, 1991). Además, el EGF estimula la elongación de las vellosidades. Esto da como resultado un aumento en la superficie apical y un aumento general en la absorción de nutrientes (Hardin *et al.*, 1999). La absorción de hidratos de carbono se facilita además por la secreción de la amilasa pancreática estimulada por EGF (Piiper *et al.*, 1994).

Varios estudios han mostrado un efecto positivo de la aplicación de EGF en modelos animales experimentales para el síndrome del intestino corto (Helmrath *et al.*, 1988; Chaet *et al.*, 1994; O'Loughlin *et al.*, 1994; Swaniker *et al.*, 1996; Lukish *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 1997).

45 Los efectos mediados por EGF después de la resección intestinal son muy dependientes de la dosis: hasta un cierto límite, la adaptación aumenta al aumentar la dosis. En estudios intestinales, la dosis normal se sitúa entre 30 y 300 µg/kg de peso corporal/día. La aplicación sistémica así como la parenteral parecen eficaces. Sin embargo, se puede no querer la aplicación sistémica por sus posibles efectos secundarios: varias neoplasias tienen receptores de EGF, y un aumento general en la concentración de EGF en sangre podría estimular la formación de tumores. La aplicación entérica de EGF, sin embargo, es menos eficaz ya que la pepsina puede procesar el EGF maduro a una forma truncada que sólo tiene el 25% de la actividad biológica inicial (Playford *et al.*, 1995).

50 De forma sorprendente, se ha sido capaz de demostrar que se puede administrar el EGF *in situ* mediante bacterias del ácido láctico recombinantes que producen EGF. La producción y secreción eficaces de EGF por bacterias del ácido láctico no es obvia, y necesita la optimización de la secuencia codificante. Además, no se puede pronosticar que las bacterias del ácido láctico sobrevivan lo suficiente el paso a través del estómago para producir la cantidad apropiada de EGF para estimular el crecimiento de las vellosidades, para fomentar la absorción de nutrientes y para tratar el síndrome de intestino corto.

60 Es un primer aspecto de la invención proporcionar una bacteria del ácido láctico productora de EGF. Preferiblemente, dicha bacteria del ácido láctico secreta el EGF producido al medio de crecimiento. Preferiblemente, dicha bacteria del ácido láctico es un *Lactococcus lactis* o un *Lactobacillus casei*. Incluso más preferiblemente, dicha bacteria del ácido láctico comprende la SEQ ID N° 1 y/o la SEQ ID N° 3. Una forma de realización preferida es un *Lactococcus lactis* que produce EGF que comprende la SEQ ID N° 3. Otra forma de realización preferida es un *Lactobacillus casei* que comprende la SEQ ID N° 3.

ES 2 302 945 T3

Otro aspecto de la invención es el uso de una bacteria del ácido láctico productora de EGF según la invención que fomenta la absorción intestinal. Los métodos para medir la absorción intestinal son conocidos para el experto en la materia. Aún otro aspecto de la invención es el uso de una bacteria del ácido láctico productora de EGF según la invención para tratar el síndrome del intestino corto. Preferiblemente, la bacteria del ácido láctico según la invención se aplica de forma oral; se puede tratar mediante cualquier tratamiento conocido por el experto en la materia para mejorar su supervivencia durante el paso del aparato digestivo. Como un ejemplo no limitante, se puede liofilizar o secar mediante rociado, y/o encapsular en un contenedor adecuado de modo que las bacterias solo se liberan en el intestino delgado. La encapsulación y los métodos para la administración en el intestino delgado se han descrito, entre otras en US5972685, WO0018377 y WO0022909.

La bacteria del ácido láctico, según la invención, se puede combinar con otros compuestos que tienen un efecto positivo en la absorción intestinal, y/o aumentan el efecto positivo del EGF. Como un ejemplo no limitado, se puede usar glutamina en combinación con la bacteria del ácido láctico según la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esbozo de la construcción de pT1hEGF. La construcción de pT1mEGF se lleva a cabo de una manera similar.

Figura 2: Expresión de mEGF (A) y hEGF (B) en *L. lactis* y *L. casei*. Los sobrenadantes de los cultivos según se indica se separan en un gel de poliacrilamida del 20% y las proteínas se detectan usando inmunotransferencia.

Figura 3: Longitud media de las vellosidades de los ratones tratados con *Lactococcus lactis* o *Lactobacillus casei*, transformadas con el vector vacío pT1NX (pT1NX), el vector pT1mEGF, que expresa EGF murino (mEGF) o con el vector pT1hEGF que expresa EGF humano (hEGF). Se usan ratones tratados con medio BM9 como un control negativo adicional (BM9).

Ejemplos

Medios y cepas

- M17: - 5 g de triptona Bacto
- 5 g de soytona Bacto
- 5 g de digerido de carne
- 2,5 g de digerido de levadura
- 0,5 g de ácido ascórbico
- 0,25 g de MgSO₄
- 19 g de β-glicerofosfato de sodio en 1 l de agua desionizada.

GM17: M17 con glucosa al 0.5%.

- Medio de recuperación: - 1 ml de 2 X M17
- 0,5 ml de sacarosa 2 M
- 50 μl de glucosa al 20%
- 40 μl de MgCl₂ 1 M
- 4 μl de CaCl₂ 1 M
- 406 μl de H₂O

El medio de agar se obtiene añadiendo agar al 1,2%.

ES 2 302 945 T3

Medio de expresión BM9: - 60 g de Na₂HPO₄
 - 30 g de KH₂PO₄
 5 - 10 g de NH₄Cl
 - 5 g de NaCl
 - tampón CO₃ 50 mM
 10 - MgSO₄ 2 mM
 - CaCl₂ 0,1 mM
 - casitona al 0.5% (Difco)
 15 - glucosa al 0,5%
 en 1 litro de H₂O.

20 *L. lactis* MG1363 es un derivado libre de plásmido y profago de la cepa NCDO 712 de *L. lactis* (Gasson, 1983).

Ejemplo 1

25 Optimización de la secuencia codificante de EGF para expresión en *Lactococcus*

30 Tanto el murino como el humano están disponibles en bases de datos públicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> número de acceso X04571 para hEGF y NM_010113 para mEGF). Las secuencias codificantes se adaptaron para optimizar la expresión en *Lactococcus*. En base a estas secuencias, se diseñaron series de cebadores para ensamblar las secuencias codificantes optimizadas tanto de hEGF como de mEGF. En el extremo 3' de la secuencia codificante, se introdujo un sitio de restricción SpeI. Los cebadores se muestran en la tabla 1 (hEGF) y tabla 2 (mEGF).

35 TABLA 1

Oligos usados para el ensamblaje de hEGF, y las cantidades disponibles

Sentido		
HEGF01	AACTCAGATTCAGAATGTCCACTTTCACACGATGGTTACT	33,3 nmol
HEGF02	GTTTGCACGATGGTGTGGTATGTACATCGAAGCTCTTGA	34,8 nmol
HEGF03	TAAATACGCTTGTAAGTGTGGTGGTTACATCGGTGAA	26,9 nmol
45 HEGF04	CGTTGTCAATACCGTGATTTGAAATGGTGGGAACCTCGTT	28,8 nmol
HEGF05	AACTAGTCTGCAGAATCTAG	29,7 nmol
Antisentido		
HEGF06	CTAGATTCTGCAGACTAGTTAACGAAGTTCCCACCATTTC	31,1 nmol
50 HEGF07	AAATCACGGTATTGACAACGTTCCCGATGTAACCAACAA	22,5 nmol
HEGF08	CACAGTTACAAGCGTATTTATCAAGAGCTTCGATGTACAT	23,6 nmol
HEGF09	ACAAACACCATCGTGCAAACAGTAACCATCGTGTGAAAGT	28,4 nmol
55 HEGF10	GGACATTCTGAATCTGAGTT	37,8 nmol

ES 2 302 945 T3

TABLA 2

Oligos usados para el ensamblaje de mEGF, y las cantidades disponibles

Sentido		
MEGF01	AACTCATACCCAGGTTGTCCATCATCATAACGATGGTTACT	29,7 nmol
MEGF02	GTTTGAACGGTGGTGTGGTATGCACATCGAATCACTTGA	28,0 nmol
MEGF03	TTCATACACTTGTAACTGTGTTATCGGTTACTCAGGTGAT	20,0 nmol
MEGF04	CGTTGTCAAACCTCGTGATTTGCGTTGGTGGGAACCTTCGTT	25,5 nmol
MEGF05	AACTAGTCTGCAGAATCTAG	29,7 nmol
Antisentido		
MEGF06	CTAGATTCTGCAGACTAGTTAACGAAGTTCCCACCAACGC	33,4 nmol
MEGF07	AAATCACGAGTTTGACAACGATCACCTGAGTAACCGATAA	30,2 nmol
MEGF08	CACAGTTACAAGTGTATGAATCAAGTGATTCGATGTGCAT	27,3 nmol
MEGF09	ACAAACACCACCGTTCAAACAGTAACCATCGTATGATGAT	26,2 nmol
MEGF10	GGACAACCTGGGTATGAGTT	40,3 nmol

Los oligonucleótidos se disolvieron en agua a una concentración de 100 μ M, y se usaron a una concentración diluida 10 veces.

Se añadió 1 μ l de cada oligonucleótido a 10 μ l de tampón de Taq, 8 μ l de Mg^{2+} 2 mM, 2 μ l de XTP 0,5 mM, 5u de ADN polimerasa Taq (Boehringer, Mannheim, Alemania) y 1 u de ADN polimera Pfu (Promega, Madison, EE.UU.). A la mezcla de reacción se añadió agua hasta 100 μ l. La reacción de PCR se lleva a cabo durante 300 segundos a 94°C, seguido por 30 veces el ciclo de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 48°C y 30 segundos a 72°C, con un paso final de 10 segundos a 15°C. Después del ensamblaje hEGF y mEGF se amplifican en una mezcla de PCR que contienen 1 μ l de ADN polimerasa Vent (New England Biolabs; Beverly, EE.UU.), 10 μ l de tampón de Taq, 4 μ l de XTP 0,5 mM, 5 μ l de cada oligonucleótido 0,5 μ M, 1 μ l de ADN molde, 1 μ l de Mg_2SO_4 2 mM y 74 μ l de H_2O .

En el caso de hEGF se usaron HEGF01 y HEGF06 como cebadores, para mEGF, se usaron MEGF01 y MEGF06. Para hEGF, se usó el mismo plan de temperaturas que para el primer paso. En el caso de mEGF el paso de hibridación se llevó a cabo a 52°C en lugar de 48°C.

Después del ensamblaje, el tamaño de los fragmentos de genes optimizados se confirmó en un gel de agarosa al 2%.

Ejemplo 2

Construcción de pT1hEGF y pT1mEGF y transformación en *Lactococcus lactis*

Se liga el EGF ensamblado (tanto para hEGF como para mEGF) cortado con SpeI en un pT1NX digerido con NaeI y SpeI (Steidler *et al.*, 1995), que da como resultado pT1hEGF y pT1mEGF. Se muestra una visión de conjunto esquemática de la construcción pT1hEGF en la figura 1. Los plásmidos se transforman en células competentes de *L. lactis* mediante electroporación. Se electroporan 50 μ l de células en una cubeta de 2 mm previamente enfriada, a 25 μ F, 2,5 kV y 400 Ω (electroporador de Bio-Rad). *L. lactis* se hacen competentes haciendo crecer una dilución 1/100 de un cultivo saturado, en 200 ml de GM17 con glicina al 2,5%, hasta una OD₆₀₀ de 0,5 (Wells *et al.*, 1993). Después de la electroporación, se añade 1 ml de medio de recuperación, y las células se incuban durante 1,5 horas a 28°C. Las células se siembran en medio GM17 sólido, que comprende eritromicina 5 μ g/ml.

Para la transformación de *L. casei*, el plásmido se aísla de *L. lactis* mediante un Qiagen-tip 100, según las instrucciones del fabricante. El ADN se transforma en células competentes de *L. casei*. Las células de *L. casei* se hacen competentes haciendo crecer una dilución 1/50 de un cultivo crecido durante la noche en 50 ml de MRS (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) con glicina al 1% a 37°C, hasta una OD₆₀₀ de 0,6. Las células se recogen y se lavan dos veces con 10 ml de Na_3PO_4 5 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 1 mM, y se resuspenden en 500 μ l de tampón de electroporación (sacarosa 0,3 M, Na_3PO_4 5 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 1 mM). Se añaden 10 μ l del ADN a 50 μ l de células competentes y la electroporación se lleva a cabo en un electroporador de Bio-Rad. Después de la electroporación, se añaden 450 μ l de MRS y las células se incuban durante 2 horas a 37°C. Las células se siembran en MRS agar con eritromicina 5 μ g/ml. La presencia del plásmido se confirma usando PCR.

ES 2 302 945 T3

Ejemplo 3

Expresión de EGF en L. lactis y L. casei

5 Las cepas de *L. lactis* MG1363 [pT1NX], MG1363 [pT1mEGF] y MG1363 [pT1hEGF] transformadas se inoculan en 5 ml de GM17 que comprende eritromicina 5 µg/ml, y se hacen crecer durante la noche a 30°C. Este precultivo se diluye 1/100 en 5 ml de GM17 con eritromicina, y se incuba durante 3 horas a 28°C. El cultivo se centrifuga y se resuspende en medio de expresión BM9, y se incuba durante la noche a 28°C. Las cepas de *L. casei* transformadas se hacen crecer en condiciones similares, pero usando MRS como precultivo, y BM9 como medio de expresión.

10 Al sobrenadante del cultivo, se añade 1/10 volúmenes de desoxicolato de sodio, y la mezcla se mantiene en hielo durante 10 minutos. Se añade 1/10 de volumen de TCA al 100% y la mezcla se incuba en hielo durante 15 minutos. Después de centrifugar, el sedimento se disuelve en 50 µl de H₂O y 50 µl de Tris-HCl 1 M pH 9,5. Las proteínas se analizan en un gel de proteínas de Laemmli del 20%. La detección se lleva a cabo usando inmunotransferencia, con anti hEGF policlonal de ratón, y anti mEGF de conejo como anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo marcados con fosfatasa alcalina eran de Southern Biotechnology (Birmingham, EE.UU.). Los resultados se resumen en la figura 2.

Ejemplo 4

Ensayo in vivo en ratones, usando las cepas de bacterias del ácido láctico transformadas

20 Para evaluar el efecto de las bacterias del ácido láctico transformadas y el crecimiento de las vellosidades y la absorción intestinal, se trataron siete grupos de ratones Balb/c (IFFA CREDO CR Broekman/Sulzfeld) con una cepa de bacterias del ácido láctico que expresaba mEGF o hEGF. Se dio a los ratones *L. lactis* y *L. casei* transformadas con un vector vacío pT1NX, o con medio BM9 como control negativo.

30 Se inoculan 600 µl de *L. casei* en 15 ml de MRS con eritromicina 10 µg/ml. En el caso de *L. lactis*, se usa GM17 en lugar de MRS, y solo se usan 5 µg/ml de eritromicina para la selección. *L. casei* se incuba durante la noche a 37°C, para *L. lactis*, se usan 30°C. El cultivo crecido durante la noche se recoge por centrifugación, y el sedimento se resuspende en 1,5 ml de medio de expresión BM9. Se suministran 100 µl de esta solución a diario, durante un período de cuatro semanas. Al final del experimento, los ratones se sacrifican y se aísla el intestino. El tejido se fija en formaldehído tamponado y las secciones finas se colorean usando hematoxilina y eosina G, para el análisis microscópico de las vellosidades. Se mide la longitud de las vellosidades en varios puntos para obtener una media representativa. Todas las secciones se tomaron del íleon terminal.

Los resultados se resumen en la figura 3. Especialmente *L. casei* [pT1hEGF] tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de vellosidades, y debería fomentar la absorción intestinal.

40 Referencias

- **Carpenter, C.D., Ingraham, H.A., Cochet, C., Walton, G.M., Lazar, C.S., Sodawski, J.M., Rosenfeld, M.G. y Gill, G.N. (1991).** Structural analysis of the transmembrane domain of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 5750-5755.

45 - **Chaet, M.S., Arya, G., Ziegler, M.M. y Warner, B.W. (1994)** Epidermal growth factor enhances intestinal adaptation after massive small bowel resection. *J Pediatr Surg* 29, 1035-1039.

50 - **Dunn, J.C., Parungo, C.P., Fonkalsrund, E.W., McFadden, D.W. y Ashley, S.W. (1997)** Epidermal growth factor selectively enhances functional enterocyte adaptation after massive small bowel resection. *J Surg Res.* 67, 90-93.

55 - **Gasson, M.J. (1983)** Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154, 1-9.

- **Gu, Y., Wu, Z.H., Xie, J.X., Jin, D.Y. y Zhuo, H.C. (2001)** Effects of growth hormone (rhGH) and glutamine supplemented parenteral nutrition on intestinal adaptation in short bowel rats. *Clin Nutr* 20, 159-166.

60 - **Hardin, J.A., Chung, B., O'Loughlin, E.V. y Gall, D.G. (1999)** The effect of epidermal growth factor on brush border surface area and function in the distal remnant following resection in the rabbit. *Gut* 44, 26-32.

- **Helmrath, M.A., Shin, C.E., Fox, J.W., Erwin, C.R. y Warner, B.W. (1988)** Adaptation after small bowel resection is attenuated by sialoadenectomy: the role for endogenous epidermal growth factor. *Surgery* 124, 848-854.

65 - **Jeppesen, P.B., Hartmann, B., Hansen, B.S., Thulesen, J., Holst, J.J., Mortensen P.B. (1999)** Impaired meal stimulated glucagon-like peptide 2 response in ileal resected short bowel patients with intestinal failure. *Gut* 45, 559-563.

ES 2 302 945 T3

- **Jeppesen, P.B., Hartmann, B., Thulesen, J., Graff, J., Lohmann, J., Hansen, B.S., Tofteng, F., Poulsen, S.S., Madsen, J.L., Holst, J.J. y Mortensen, P.B. (2001)** Glucagon-like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short-bowel patients with no colon. *Gastroenterology* 120, 806-815.

5 - **Lukish, J., Schwartz, M.Z., Rushin, J.M. y Riordan, G.P. (1997)** A comparison of the effect of growth factors on intestinal function and structure in short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 32, 1652-1655.

- **Marti, U., Burwen, S.J. y Jones, A.L. (1989)** Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: an update. *Hepatology* 9, 126-138.

10 - **O'Loughlin, E., Winter, M., Shun, A., Hardin, J.A. y Gall, D.G. (1994)** Structural and functional adaptation following jejunal resection in rabbits: effect of epidermal growth factor. *Gastroenterology* 107, 87-93.

15 - **Opleta-Madsen, K., Hardin, J. y Gall, D.G. (1991)** Epidermal growth factor upregulates intestinal electrolyte and nutrient transport. *Am J Physiol* 260, G807-814.

- **Pearson, P.Y., O'Connor, D.M. y Schwartz, M.Z. (2001)** Novel effect of leptin on small intestine adaptation. *J Surg Res* 97, 192-195.

20 - **Piiper, A., Stryjek-Kaminska, D., Stein, J., Caspary, W.F. y Zeuzem, S. (1994)** Tyrphostins inhibit secretagogue-induced 1,4,5-IP₃ production and amylase release in pancreatic acini. *Am J Physiol*. 266, G363-371.

- **Playford, R.J., Marchbank, T., Calnan, D.P., Calam, J., Royston, P., Batten, J.J. y Hansen, H.F. (1995)** Epidermal growth factor is digested to smaller, less active forms in acidic gastric juice. *Gastroenterology* 108, 92-101.

25 - **Scott, R.B., Kirk, D., MacNaughton, W.K. y Meddings, J.B. (1998)** GLP-2 augments the adaptive response to massive intestinal resection in rat. *Am J Physiol* 275, G911-921.

30 - **Swaniker, F., Guo, W., Diamond, J. y Fonkalsrud, E.W. (1996)** Delayed effects of epidermal growth factor after extensive small bowel resection. *J Pediatr Surg* 31, 56-60.

- **Wells, J.M., Wilson, P.W. y Le Page, R.W. (1993)** Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacteriol* 74, 629-636.

35 - **Zhou, X., Li, Y.X., Li, N. y Li J.S. (2001)** Effect of bowel rehabilitative therapy on structural adaptation of remnant small intestine: animal experiment. *World J Gastroenterol* 7, 66-73.

40

45

50

55

60

65

ES 2 302 945 T3

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria del ácido láctico productora de EFG que comprende la SEQ ID N° 1.

5

2. Una bacteria del ácido láctico productora de EFG que comprende la SEQ ID N° 3.

3. Una bacteria del ácido láctico según la reivindicación 1 ó 2 en donde dicha bacteria del ácido láctico es *Lactococcus lactis*.

10

4. Una bacteria del ácido láctico según la reivindicación 1 ó 2 en donde dicha bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus casei*.

5. El uso de una bacteria del ácido láctico productora de EGF para fomentar la absorción intestinal.

15

6. El uso de una bacteria del ácido láctico productora de EGF para la fabricación de un medicamento para tratar el síndrome del intestino corto.

7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en donde la bacteria del ácido láctico comprende la SEQ ID N° 1.

20

8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en donde la bacteria del ácido láctico comprende la SEQ ID N° 3.

9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde dicha bacteria del ácido láctico es *Lactococcus lactis*.

25

10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde dicha bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus casei*.

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1:

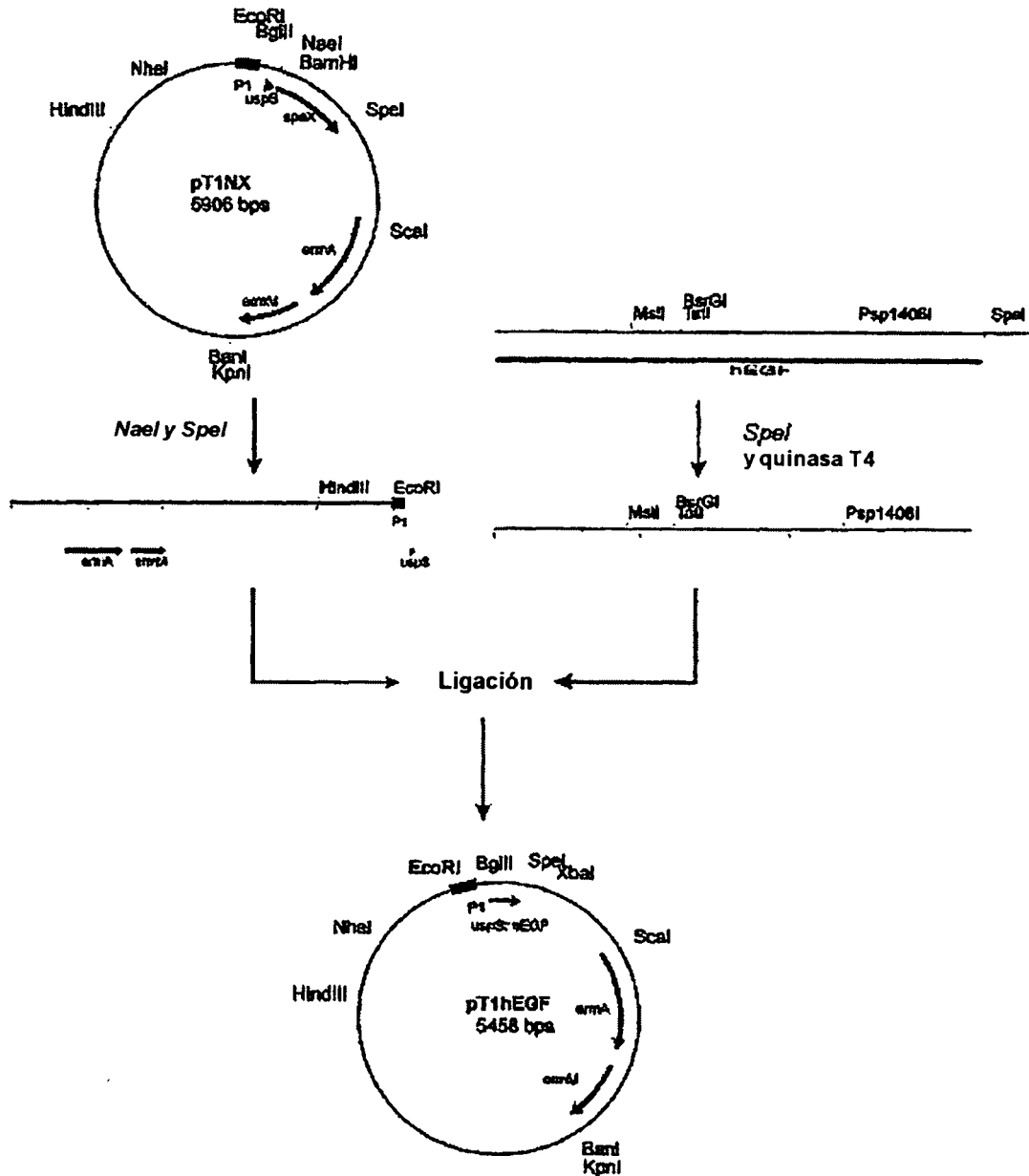


Fig. 2A:

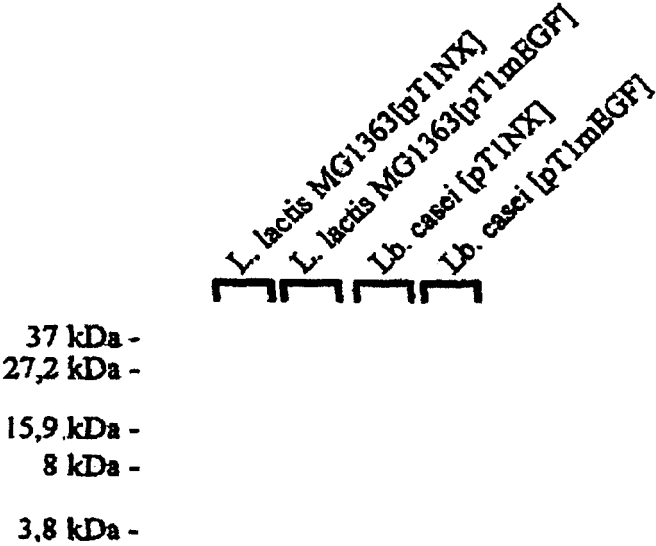


Fig. 2B:

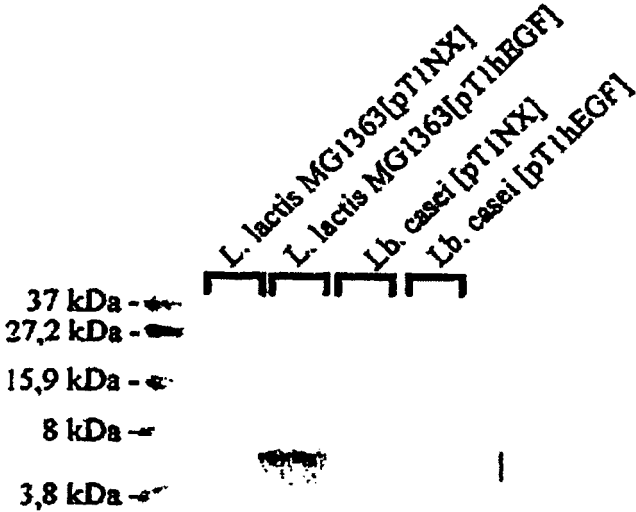
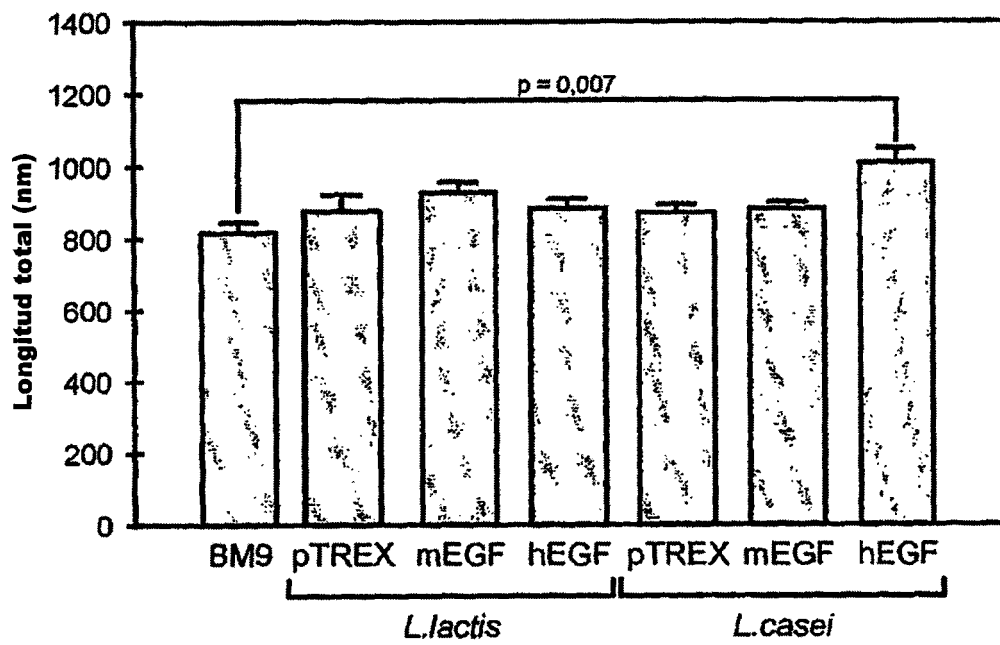


Fig. 3:



ES 2 302 945 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR BIOTECHNOLOGIE VZW UNIVERSITEIT GENT

5 <120> MÉTODOS Y MEDIOS PARA FOMENTAR LA ABSORCIÓN INTESTINAL

<130> LST-EGF-V117

10 <150> EP 02077532.6

<151> 19-06-2002

15 <160> 24

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20 <211> 166

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(150)

<223>

30 <220>

<221> característica miscelánea

<223> hEGF

35 <400> 1

```
aac tca gat tca gaa tgt cca ctt tca cac gat ggt tac tgt ttg cac      48
Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His
 1                5                10                15
```

```
gat ggt gtt tgt atg tac atc gaa gct ctt gat aa a tac gct tgt aac      96
Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
                20                25                30
```

```
tgt gtt gtt ggt tac atc ggt gaa cgt tgt caa tac cgt gat ttg aaa      144
Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
                35                40                45
```

```
tgg tgg gaacttcggt aactag      166
Trp Trp
 50                50
```

<210> 2

<211> 50

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

60 <221> característica miscelánea

<223> hEGF

65

ES 2 302 945 T3

<400> 2

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His
 1 5 10 15

5

Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
 20 25 30

10

Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
 35 40 45

15

Trp Trp
 50

<210> 3

20 <211> 166

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

25

<221> CDS

<222> (1)...(150)

<223>

30

<220>

<221> característica miscelánea

<223> mEGF

35 <400> 3

aac tca tac cca ggt tgt cca tca tca tac gat ggt tac tgt ttg aac 48
 Asn Ser Tyr Pro Gly Cys Pro Ser Ser Tyr Asp Gly Tyr Cys Leu Asn
 1 5 10 15

40

ggt ggt gtt tgt atg cac atc gaa tca ctt gat tca tac act tgt aac 96
 Gly Gly Val Cys Met His Ile Glu Ser Leu Asp Ser Tyr Thr Cys Asn
 20 25 30

45

tgt gtt atc ggt tac tca ggt gat cgt tgt caa act cgt gat ttg cgt 144
 Cys Val Ile Gly Tyr Ser Gly Asp Arg Cys Gln Thr Arg Asp Leu Arg
 35 40 45

50

tgg tgg gaacttcggt aact ag 166
 Trp Trp
 50

<210> 4

<211> 50

55

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> característica miscelánea

60

<223> mEGF

65

ES 2 302 945 T3

<400> 4

Asn Ser Tyr Pro Gly Cys Pro Ser Ser Tyr Asp Gly Tyr Cys Leu Asn
 1 5 10 15

5

Gly Gly Val Cys Met His Ile Glu Ser Leu Asp Ser Tyr Thr Cys Asn
 20 25 30

10

Cys Val Ile Gly Tyr Ser Gly Asp Arg Cys Gln Thr Arg Asp Leu Arg
 35 40 45

15

Trp Trp
 50

<210> 5

20 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> HEGF01

<400> 5

30 aactcagatt cagaatgtcc actttcacac gatggttact

40

<210> 6

<211> 40

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> HEGF02

<400> 6

45 gttgcacga tgggtttgt atgtacatcg aagctcttga

40

<210> 7

<211> 40

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HEGF03

55

<400> 7

taaatacgct tgtaactgtg ttgttggtta catcggtgaa

60

<210> 8

<211> 40

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HEGF04

ES 2 302 945 T3

	<400> 8	
	cgttgtcaat accgtgattt gaaatggtgg gaacttcgtt	40
5	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HEGF05	
15	<400> 9	
	aactagtctg cagaatctag	20
20	<210> 10	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> HEGF06	
30	<400> 10	
	ctagattctg cagactagtt aacgaag ttc ccaccatttc	40
35	<210> 11	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> HEGF07	
45	<400> 11	
	aatcacggt atfgacaacg ttcaccgatg taaccaacaa	40
50	<210> 12	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> HEGF08	
60	<400> 12	
	cacagttaca agcgtattta tcaagagctt cgatgtacat	40
65	<210> 13	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 302 945 T3

	<220>	
	<223> HEGF09	
5	<400> 13	
	acaaacacca tcgtgcaaac agtaaccatc gtgtgaaagt	40
10	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> HEGF10	
	<400> 14	
20	ggacattctg aatctgagtt	20
	<210> 15	
25	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> MEGF01	
	<400> 15	
35	aactcatacc caggtgtcc atcatcatac gatggttact	40
	<210> 16	
40	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> MEGF02	
	<400> 16	
50	gtttgaacgg tgggtttgt atgcacatcg attcactga	40
	<210> 17	
	<211> 40	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> MEGF03	
	<400> 17	
65	ttcatacact tgtaactgtg ttatcgggta ctcaggtgat	40
	<210> 18	
	<211> 40	

ES 2 302 945 T3

	<p><212> ADN</p>	
	<p><213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220></p>	
5	<p><223> MEGF04</p>	
	<p><400> 18</p>	
10	<p>cgttgtcaaa ctcgtgattt gcgttggtgg gaactcgtt</p>	40
	<p><210> 19</p>	
	<p><211> 20</p>	
15	<p><212> ADN</p>	
	<p><213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220></p>	
20	<p><223> MEGF05</p>	
	<p><400> 19</p>	
25	<p>aactagtctg cagaatctag</p>	20
	<p><210> 20</p>	
	<p><211> 40</p>	
30	<p><212> ADN</p>	
	<p><213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220></p>	
35	<p><223> MEGF06</p>	
	<p><400> 20</p>	
40	<p>ctagattctg cagactagtt aacgaagttc ccaccaacgc</p>	40
	<p><210> 21</p>	
	<p><211> 40</p>	
	<p><212> ADN</p>	
45	<p><213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220></p>	
50	<p><223> MEGF07</p>	
	<p><400> 21</p>	
55	<p>aatcacgag tttgacaacg atcacctgag taaccgataa</p>	40
	<p><210> 22</p>	
	<p><211> 40</p>	
	<p><212> ADN</p>	
60	<p><213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220></p>	
65	<p><223> MEGF08</p>	
	<p><400> 22</p>	
65	<p>cacagttaca agtgtatgaa tcaagtgatt cgtgtgcat</p>	40

ES 2 302 945 T3

<210> 23
<211> 40
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> MEGF09
10 <400> 23
acaacacca ccgtcaaac agtaaccatc gtatgatgat 40
15 <210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> MEGF10
25 <400> 24
ggacaacctg ggtatgagtt 20
30
35
40
45
50
55
60
65