



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 274 019**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/31 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **02718062 .9**

⑧6 Fecha de presentación : **30.01.2002**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1358332**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2003**

⑤4 Título: **Serpin en Bifidobacteria.**

③0 Prioridad: **30.01.2001 EP 01102050**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

⑦3 Titular/es: **Société des produits NESTLÉ S.A.**
Case Postale 353
1800 Vevey, CH

⑦2 Inventor/es: **Arigoni, Fabrizio;**
Blum, Stéphanie;
Delley, Michele;
Schell, Mark, Alan y
Schiffrin, Eduardo

⑦4 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 274 019 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

Serpin en Bifidobacteria.

5 La presente invención pertenece a un gen novedoso de Bifidobacterias y a polipéptidos codificados por él. En particular, la presente invención pertenece a un gen que pertenece a la superfamilia de Serpin y su uso en la producción de Serpines bacterianas. También se proporcionan vectores, células hospedadoras, y procedimientos para producir polinucleótidos de Serpin de bacterias y/o polipéptidos.

10 Las bacterias del ácido láctico se han utilizado para la conservación y preparación de material de alimentación durante mucho tiempo teniendo beneficio del bajo pH y la acción de productos generados durante la actividad fermentadora del mismo. Además, las bacterias del ácido láctico están implicadas en la producción de una diversidad de productos de alimentación diferentes, tales como queso o yogurt.

15 Muy recientemente las bacterias de ácido láctico, en particular Lactobacilos y Bifidobacterias, han atraído una gran cantidad de atención en la que algunas cepas se han encontrado que muestran propiedades valiosas para el hombre y animales tras la ingestión. Estas cepas, que se denominan genéricamente probióticos, se han encontrado que son capaces de sobrevivir a las condiciones ambientales graves que prevalecen en el tracto gástrico y son capaces de al menos colonizar de manera transitoria en la mucosa intestinal, donde se producen efectos positivos para los seres vivos que los han incorporado.

20 En el documento EP 0 768 375 se describe tal cepa probiótica del grupo del género Bifidobacterium, que es capaz de llegar a implantarse en la flora intestinal. Este Bifidobacterium se reseña para asistir en la modulación inmune del huésped, siendo capaz de excluir de manera competitiva la adhesión de bacterias patógenas para las células intestinales, apoyando de esta manera el mantenimiento de la salud de los individuos.

Además, en el documento EP 0 577 903 se hace referencia al uso de una bacteria de ácido láctico que tiene la capacidad de reemplazar *Helicobacter pylori*, la causa reconocida para el desarrollo de úlceras.

30 También, en el documento WO 97/00078 una cepa específica de lactobacilo, denominada Lactobacillus GC (ATCC 53103), se describe como tal probiótico. El microorganismo se puede emplear para prevenir o tratar reacciones de hipersensibilidad inducidas por alimentos.

35 En vista de las propiedades valiosas que estas cepas probióticas pueden proporcionar, existe un gran deseo para obtener información más detallada acerca de la biología de estas cepas, especialmente acerca de la interacción con los huéspedes, el fenómeno de supervivencia a las condiciones ambientales diferentes en el intestino así como acerca de la capacidad de adherirse a la mucosa del intestino. En particular su implicación en la potenciación del sistema inmune y defensa contra los patógenos es de alto interés.

40 Por consiguiente, un problema de la presente invención es proporcionar los datos sobre las cepas bacterianas que muestran propiedades beneficiosas para el hombre y/o animales y ocasionalmente explicación.

45 En la línea de investigación del genoma de la cepa de Bifidobacterium probiótico BL29 los presentes inventores han encontrado sorprendentemente un gen que muestra una homología moderada a los genes que pertenecen a la superfamilia de Serpin (inhibidores de la serina proteasa). Los genes para tal tipo de genes se han encontrado solamente hasta ahora en células de organismos superiores, tales como seres humanos y plantas, pero no en células bacterianas.

50 Por consecuencia, la presente invención proporciona un polinucleótido como se identifica por la SEQ ID N° 1 o partes o variantes del mismo que codifican un polipéptido funcional, dichas variantes tienen una homología con la SEQ ID N° 1 de aproximadamente 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, incluso más preferiblemente 90%, incluso más preferido 95%.

55 De acuerdo con una realización alternativa la presente invención también pertenece a un polipéptido identificado mediante la SEQ ID N° 2 o partes funcionales o variantes del mismo, dichas variantes tienen una homología con dicha SEQ ID N° 2 de aproximadamente 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, incluso más preferiblemente 90%, incluso más preferido 95%.

60 Los inhibidores de las serina proteasas (Serpines) comprenden un grupo diverso de proteínas que forman una superfamilia incluyendo más de 100 miembros. La mayoría de Serpines actúan como inhibidores de proteasa y están implicadas en la regulación de varios procesos fisiológicos activados por proteinasa, importantes para el individuo, tales como coagulación de sangre, lisis mediada por complementos, la respuesta inmune, glomerulonefritis, sensibilidad al dolor, inflamación, pancreatitis, cáncer, regulación de la fertilización, infección bacteriana y maduración viral. Aunque la función principal de los Serpines parece que neutraliza la actividad de la serina proteasa, estos polipéptidos también se han encontrado que juegan un papel en la matriz extracelular que remodela la migración celular.

65 Los ejemplos de los Serpines incluyen, al-antitripsina, antitrombina III, inhibidor 1 del activador de plasminógeno (PAI-1) o inhibidor 2 del activador de plasminógeno.

Los Serpines conocidos hasta ahora han sido el sujeto de investigación intensiva y todos parece que tienen un bucle característico común, denominado el bucle del sitio reactivo (RSL), que se extiende desde la superficie de la molécula que contiene la secuencia de reconocimiento para el sitio activo de la serina proteasa afín. La especificidad de cada inhibidor se considera que se determina principalmente por la identidad del aminoácido que está inmediatamente amino-terminal al sitio de escisión potencial del inhibidor por la serina proteasa. Este aminoácido, conocido como el residuo del sitio Pi, se considera que forma un enlace acilo con la serina en el sitio activo de la serina proteasa.

Los Serpines parece que actúan como “inhibidores suicidas” que forman un complejo estequiométrico 1 : 1 con la proteasa diana, bloqueando de esta manera su actividad. De acuerdo con los datos recientes se han indicado que el inhibidor se escinde en el centro reactivo y que el complejo está lo más probablemente atrapado como un complejo acilo-enzima covalente.

Ya que los Serpines están implicados en los procesos biológicos sofisticados tales como la modulación del sistema inmune o reacciones de inflamación o incluso la remodelación de la matriz extracelular o un ser vivo superior no se ha esperado su presencia en procariotas.

Los presentes inventores son por lo tanto los primeros que han encontrado que también algunas células bacterianas pueden contener Serpines. Sin querer estar unido a ninguna teoría se asume actualmente que las propiedades probióticas, tales como modulación del sistema inmune o la propiedad conocida de la cepa de Bifidobacterias, a partir de las que se derivan, puede al menos en parte deberse a la presencia del presente Serpin.

En el contexto de esta solicitud una secuencia de ácido nucleico designará un polinucleótido como se identifica por la SEQ ID N° 1 o partes o variantes del mismo, que producen un polipéptido funcional. Con este fin, el polinucleótido mostrado en la SEQ ID N° 1 puede estar truncado en sus extremos hasta un grado, en el que el polipéptido resultante todavía produce la función biológica. Del mismo modo, el polinucleótido también puede estar modificado mediante supresión, añadiendo o reemplazando uno o más nucleótidos, con la condición de que el polipéptido resultante ejerza todavía su función biológica.

De manera similar, la muestra se aplica al polipéptido descrito en esta memoria descriptiva. El término polipéptido de acuerdo con la presente invención designará un polinucleótido como se identifica por la SEQ ID N° 2 o partes o variantes del mismo, que son funcionales. Por lo tanto, el polipéptido de la SEQ ID N° 2 puede estar truncado en sus extremos hasta un grado, en el que el polipéptido todavía produce la función biológica. Del mismo modo, el polinucleótido también puede estar modificado teniendo uno o más aminoácidos que están suprimidos, añadidos o reemplazados, con la condición de que el polipéptido resultante ejerza todavía su función biológica.

De acuerdo con una realización, el polinucleótido anteriormente mencionado se inserta en una célula hospedadora adecuada y se expresa en ella. Para este propósito, un polinucleótido de acuerdo con la presente invención se puede insertar en un vector adecuado, que permite la propagación y/o expresión en la célula huésped deseada y se inserta en ella. El vector contendrá un gen marcador que permita una propagación estable.

Del mismo modo, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención también se puede incluir en el genoma del huésped, usando el fenómeno de la recombinación homóloga u otras técnicas, que permiten la inserción de un ácido nucleico solamente en el cromosoma del huésped. Tal técnica se describe, por ejemplo, en el documento EP 93 105 303.7, cuyo contenido se incorpora en esta memoria descriptiva como referencia.

El polinucleótido de acuerdo con la presente invención se puede poner bajo el control de un regulón endógeno o exógeno, por ejemplo, un promotor, dependiendo de si el producto del gen se sobreexpresará, es decir, para recoger y purificar el polipéptido, o expresarse hasta un cierto grado a administrar a un individuo mediante un sistema vehículo, tal como un microorganismo. El regulón, por ejemplo, el promotor, es preferiblemente regulable y/o inducible y se unirá operativamente a la molécula codificadora mediante cualquiera de las metodologías bien reconocidas y fácilmente practicadas para realizarlo de esta manera.

Estas construcciones recombinantes se introducen después para expresión en células huéspedes adecuadas tales como, por ejemplo, *E. coli*, Lactobacilos, Estreptococos o Bifidobacterias como una célula huésped hospedadora *Saccharomyces cerevisiae*, células de insecto, células CHO o COS como células huéspedes eucarióticas y las células huéspedes transformadas o transducidas se cultivan en condiciones en las que permiten la expresión del gen heterólogo. Se apreciará que el producto génico frl presente polinucleótido se someterá a glicosilación tras la expresión en un sistema de expresión eucariótico.

De acuerdo con otro aspecto la presente invención también comprende microorganismos recombinantes que contienen al menos una copia del polinucleótido de acuerdo con la presente invención. El polinucleótido se puede incluir en un microorganismo, que se usa para administrar la sustancia diana al individuo. A este respecto son adecuadas bacterias probióticas, ya que son capaces de pasar el tracto gastrointestinal de un individuo y llegar a implantarse al menos en la mucosa de un huésped. En esta localización ejercerá su función biológica como se observa en la presente cepa probiótica BL29, a partir de la que se deriva. Sin desear estar unido a ninguna teoría actualmente se cree que el producto génico del presente polinucleótido está implicado en la actividad antiinflamatoria mostrada por la cepa de bifidobacterias BLK29. Del mismo modo, cualquier cepa bacteriana, que ya incluye un polinucleótido de acuerdo

con la presente invención se puede usar como una célula huésped, en la que se pueden incluir copias adicionales del polinucleótido diana.

La célula huésped expresará el producto génico de un polinucleótido de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, las células hospedadoras se pueden utilizar para los estudios para la síntesis de un polipéptido de acuerdo con la presente invención a gran escala.

Una "célula huésped" de acuerdo con la presente invención se puede obtener mediante medios recombinantes, porque un polinucleótido de acuerdo con la presente invención se inserta en una célula adecuada. Sin embargo, con el fin de incrementar la cantidad de Serpin de Bifido en las Bifidobacterias que contienen tales polipéptidos cortos, las propias Bifidobacterias se pueden someter a técnicas comunes de selección de manera que se obtiene una cepa que tiene una cantidad incrementada del producto génico correspondiente.

El aislamiento de la proteína se puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos conocidos a partir de la célula huésped o a partir del sobrenadante de cultivo de la célula huésped. Tales procedimientos se describen, por ejemplo por Ausubel I., Frederick M., Current Protocols in Mol. Biol. (1992), John Wiley and Sons, Nueva York. El polipéptido se puede purificar después de la producción recombinante mediante cromatografía de afinidad usando técnicas de purificación de proteínas conocidas, incluyendo inmunoprecipitación, filtración de gel, cromatofenfoque, enfoque isoelectrico, precipitación selectiva, electroforesis, o similares.

La invención además comprende un procedimiento para detectar un polinucleótido o un polipéptido de acuerdo con la presente invención, que comprende la incubación de una muestra, por ejemplo, lisados de células o una transcripción inversa de una muestra de ARN, con cualquier polinucleótido de acuerdo con la invención y determinando la hibridación en condiciones rigurosas de dicha molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico diana para la determinación de la presencia de una molécula de ácido nucleico, o usando anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales que surgen del polipéptido de acuerdo con la presente invención. También una detección cuantitativa del gen se puede realizar mediante técnicas de PCR, preferiblemente mediante el uso de RT - PCR cuantitativa que usa, por ejemplo, el LightCycler TM de Roche Diagnostics GMBH, DE.

Ya que el gen Serpin parece estar asociado a la actividad probiótica de cepas bacterianas, el presente polinucleótido se puede del mismo modo utilizar para investigar cepas adicionales que muestran actividades probióticas.

Para determinar, si una cepa de bacterias dada puede ser apt, la cantidad aproximada de hibridación del polinucleótido con el ácido nucleico diana o ácidos nucleicos de la cepa bacteriana se determina. La cantidad aproximada de hibridación se puede determinar fácilmente cualitativamente mediante, por ejemplo, inspección visual tras detectar la hibridación. Por ejemplo, si se usa un gel para resolver ácido nucleico marcado que se hibridiza a ácido nucleico diana en la muestra, la banda resultante se puede inspeccionar visualmente. Del mismo modo, que con el uso de anticuerpos FACS se puede utilizar para una medición cuantitativa.

El polinucleótido o polipéptido de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para la identificación, caracterización y/o purificación de moléculas que afectan al proceso biológico asociado a la actividad de las serina proteasas. Los procesos biológicos ejemplares, en los que las serina proteasas están implicadas comprenden coagulación de sangre, fibrinólisis, reacciones inmunes, activación de complementos, recambio de matriz extracelular asociada a respuestas inflamatorias, migración de células y activación de prohormonas, metástasis de cáncer.

Del mismo modo, el polinucleótido o polipéptido de acuerdo con la presente invención también se puede usar para el desarrollo de moléculas eventualmente adecuadas en el tratamiento y/o diagnóstico de los estados patológicos, que implican la actividad de las serina proteasas. Una vez que la interacción del presente Serpin con las proteasas diana se ha entendido, se pueden componer los agonistas o antagonistas de las proteasas, pero del mismo modo agonistas o antagonistas de Serpines. Como se ha mencionado anteriormente, los ejemplos no limitantes de estados patológicos considerados por la presente invención son coagulación de sangre inapropiada, fibrinólisis inapropiada, reacciones inmunes, activación de complementos, recambio de matriz extracelular asociada a respuestas inflamatorias, migración de células y activación de prohormonas, metástasis de cáncer.

El uso de diversos sistemas de modelo o estudios estructurales serán capaces del desarrollo de agonistas y antagonistas específicos útiles en la regulación de la función del presente Serpin y las proteasas a las que se une. Se puede contemplar que estos pueden ser péptidos, ligandos mutados, anticuerpos u otras moléculas capaces de interactuar con el presente Serpin.

El polinucleótido de acuerdo con la presente invenciones pueden en Genaro utilizar para la síntesis del polipéptido para la producción a gran escala del mismo, mediante la expresión de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector que contiene tal secuencia de ácido nucleico en un huésped adecuado en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido y recoger y purificar el polipéptido.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitarla.

Ejemplo 1

Aislamiento del gen Serpin

5 En la línea de la secuenciación del genoma de la cepa BL29 de *Bifidobacterium longum* mediante el procedimiento de la secuenciación dirigida después de la secuenciación automática fluorescente de las inserciones de clones y ensamblaje de estas secuencias de fragmentos de nucleótidos (inserciones) mediante programas de software, se ha encontrado. Para lograr esto, se crearon fragmentos del genoma, se ligaron en vectores adecuados para la ampliación y propagación y se han secuenciado los fragmentos correspondientes. Las superposiciones y la disposición final de los
10 fragmentos, la secuencia de nucleótidos de los mismos, se determinaron mediante la ayuda los software apropiados.

Las homologías de las secuencias de proteína y/o ácido nucleico se han evaluado usando los siguientes algoritmos:

- 15 (1) BLASTP: Compara una secuencia duda de aminoácidos contra una base de datos de secuencias de proteína.
- (2) BLASTN: Compara una secuencia duda de nucleótido contra una base de datos de secuencias de nucleótidos.
- 20 (3) BLASTX: Compara una secuencia duda de nucleótido traducida en todos los marcos de lectura contra una base de datos de secuencias de proteína.
- (4) TBLASTN: Compara una secuencia duda de proteína contra una base de datos de secuencias de nucleótidos traducidos dinámicamente en marcos de lectura aU.

25 Se ha indicado una homología global modesta a a-2-antiplasmin de Serpin murino conocido de aproximadamente 43%. Incluso el presente polipéptido muestra una homología de aproximadamente 63% con el bucle del sitio reactivo (RSL) del mismo.

Ejemplo 2

30

Clonación del gen Serpin de Bifidobacterias y aislamiento del polipéptido

El polinucleótido que codifica el Serpin supuesto de Bifidobacterias sin su péptido de señal, se clonó en el vector de expresión pDEST 17 de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies) y la proteína correspondiente se produjo como proteína
35 de fusión etiquetada 6 - His en *E. coli* (Janknecht R y col., (1991): Proc. Natl. Acad. Sci USA: 88 (20) p. 8972 - 8976) de acuerdo con técnicas comunes.

La proteína etiquetada 6 - His se purificó hasta homogeneidad mediante cromatografía de afinidad de metal sobre una matriz de níquel - ácido nitrilotriacético (Ni - NTA de Quiagen) de acuerdo con las instrucciones descritas en
40 el QIA - Expressionist Handbook de Quiagen, y se usó para la producción de estudios funcionales así como para la producción de anticuerpos policlonales en conejos.

Ejemplo 3

45 *Actividad potencial antiinflamatoria de una proteína de tipo Serpin, expresada en BL29*

El polipéptido como se ha aislado en el ejemplo 2 se ha usado en un ensayo hemolítico *in vitro* con el fin de determinar su actividad como un Serpin.

50 A este extremo, se mezclaron 50 ml de dilución de duplicación sucesiva de un suero AB (Sigma) en una placa de microvaloración de 96 pocillos con 50 ml de una suspensión de eritrocitos de oveja activados por anticuerpos de oveja. Para determinar una actividad hemolítica del Serpin recombinante, 1 mg de la proteína recombinante se añadió a cada pocillo y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Después la placa se centrifugó para sedimentar las células intactas y los desechos de células y el sobrenadante se transfirieron a una nueva placa. La actividad hemolítica se
55 estimó midiendo la liberación como absorbancia a 450 nm.

La actividad de Serpin de Bifidobacterium se comparó con con al-antitripsina de serpin humano (5 mg/pocillo). Se usó agua destilada como control positivo para obtener el 100% de a lisis de eritrocitos y suero AB inactivado humano como control negativo (sin lisis debido a inactivación de complementos).

60

Los resultados indican claramente que el Serpin recombinante de Bifidobacterias inhibían la lisis de glóbulos rojos en un grado similar a la al-antitripsina humana, un inhibidor de serina proteasa.

65

ES 2 274 019 T3

SEQ. Id. N° 1

Nucleótido de Serpin

5 ATGAGCGAGCAACTGATGGAACAGTACCGGTTGCGCGGACAACGCCAAATGCCGTAACGCT
TGTATCGCCGCCATCGTGACAGTAGTGCTTGTCCCTTGCCGTGCGCGGGCGGGTATGGTGG
10 ACGGCCGGCGATGGCAGCGCATTGGTTGCAATATGTTCAAGCCGAAGGCCACGCCTGCC
ACGCAGCCGGTAGTCAACAGCACCGCAACCTTCGCCTACCGCACCGCACCGGAATTCCTG
GCGATGGAAGCCGGCGACCGAGGCACCGGCAATGTGAACTACTCTCCTGCTTCGATGTGG
15 ATGGCGTTGGCCATCGCCGCGCAGGGCGCCAATGGCACGACCGGCTCGCAACTGAACGAA
CTGCTGGGCTCCGGTTCGCTGACCGATAGCGACTACCAATCGCTGCTAAGTTCGATCAAC
GGGCAATATTCGGGGGCGAAATCCGAGATGAGCGCCGCGAACTCGCTGTGGATTGATGAC
20 GACTACTCTCTTGCCAGCGATTACCAATCCACCGTCAAGAAGATGTTGAGGGCCGAAGTC
ACCACGTTACCGTTCGACGATCAGGCCGCGCCGAAGATGTCCGATTGGATTGCCAAGCAT
ACGAATGGTTGCTCAAGCCGAAGATCACGCTGCGTGACCGTGAAGTCCTGTCCATCATC
AACACCGTCTATGCGGATGGCCGCTGGAAGGATCCGTTGGAAGAGCAGTCCACCGGCAAC
25 GGCACCTTCCACGGCGAAGCCGGAGATGCTCAGGTGCCGATGATGCACCAGACCTTCAGC
CAAATGGCTTACGGACATGATGAGTACAACACTTGGCAGCGGGTGGAGATTCCGTTGAC
AACGGCGGCAATCTGGCCATCGTGCTGCCGGCCGAAGGGCATTTCGACGAGTTGGCCGGC
30 GATGCCGAGAAGCTCAGTTGGGCGTTCCGTACATGCTCGACGGCATCCCTTGGCGAGGGC
GCAATGGGTTGCGCCGCGGACAGTATGCCCGGCTGGGGCGTCTCCGTCAACTCGGTCATG
GTGAACGTCACGCTACCGCGATTACCATCGACAGCATGTTGACTCGGAAGCCACCATC
35 AAGGCATTGAAAACTGGGGGTGACCGATGCGTTCAGTGCAGGCGACGCCGACTTCACC
AAGATGATCGACACCGGTTCCGACGGCGAGAACCTGTATATCGGCTCGATTCTGCAAGGC
ACGCGCATCGAGGTGAACGAAGCCGGCGCCAAGGCCATGTCCTTCACCAAGGTGGGCGCA
40 GACTCCGTTAGCGCGCCGGTGGACAACGTCGAGTTCACGGTGGATCGCCCATTTCTGTAT
TCGTACGTCACCCCGGACGGCATACCATTATTCATCGGTGCGGTGCGCAACCTCGGCGGA
GTCCGTGGAGAAAAC

45

50

55

60

65

SEQ. ID. N° 2

Secuencia de proteína de Serpin

5 MetSerGluGlnLeuMetGluGlnTyrArgLeuArgGlyGlnArgLysCysArgAsnAla
 CysIleAlaAlaIleValThrValValLeuValLeuAlaValAlaGlyGlyValTrpTrp
 10 ThrAlaGlyAspGlySerAlaLeuValArgAsnMetPheLysProLysAlaThrProAla
 ThrGlnProValValAsnSerThrAlaThrPheAlaTyrArgThrAlaProGluPheLeu
 15 AlaMetGluAlaGlyAspArgGlyThrGlyAsnValAsnTyrSerProAlaSerMetTrp
 MetAlaLeuAlaIleAlaAlaGlnGlyAlaAsnGlyThrThrArgSerGlnLeuAsnGlu
 LeuLeuGlySerGlySerLeuThrAspSerAspTyrGlnSerLeuLeuSerSerIleAsn
 20 GlyGlnTyrSerGlyAlaLysSerGluMetSerAlaAlaAsnSerLeuTrpIleAspAsp
 AspTyrSerLeuAlaSerAspTyrGlnSerThrValLysLysMetPheGluAlaGluVal
 ThrThrLeuProPheAspAspGlnAlaAlaAlaLysMetSerAspTrpIleAlaLysHis
 25 ThrAsnGlySerLeuLysProLysIleThrLeuArgAspArgGluValLeuSerIleIle
 AsnThrValTyrAlaAspGlyArgTrpLysAspProPheGluGluGlnSerThrGlyAsn
 30 GlyThrPheHisGlyGluAlaGlyAspAlaGlnValProMetMetHisGlnThrPheSer
 GlnMetAlaTyrGlyHisAspGluTyrAsnThrTrpGlnArgValGluIleProPheAsp
 AsnGlyGlyAsnLeuAlaIleValLeuProAlaGluGlyHisPheAspGluLeuAlaGly
 35 AspAlaGluLysLeuSerTrpAlaPheGlyThrCysSerThrAlaSerLeuGlyGluGly
 AlaMetGlyCysAlaAlaAspSerMetProGlyTrpGlyValSerValAsnSerValMet
 40 ValAsnValThrLeuProArgPheThrIleAspSerMetPheAspSerGluAlaThrIle
 LysAlaPheGluLysLeuGlyValThrAspAlaPheSerAlaGlyAspAlaAspPheThr
 LysMetIleAspThrGlySerHisGlyGluAsnLeuTyrIleGlySerIleLeuGlnGly
 45 ThrArgIleGluValAsnGluAlaGlyAlaLysAlaMetSerPheThrLysValGlyAla
 AspSerValSerAlaProValAspAsnValGluPheThrValAspArgProPheLeuTyr
 50 SerTyrValThrProAspGlyIleProLeuPheIleGlyAlaValArgAsnLeuGlyGly
 ValGlvGlvGluAsn

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido según se identifica por la SEQ ID N° 1 o partes o variantes del mismo que codifica un polipéptido funcional, dichas variantes tienen una homología con la SEQ ID N° 1 de 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, incluso más preferiblemente 90% incluso más preferiblemente 95%.
2. Un polinucleótido según se identifica por la SEQ ID N° 2 o partes funcionales o variantes del mismo que tienen un grado de homología con dicha SEQ ID N° 2 de 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, incluso más preferiblemente 90% incluso más preferiblemente 95%.
3. Un vector que contiene un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.
4. Una célula huésped que contiene una o más copias de un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o un vector de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4, en la que se expresa el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2.
6. Uso de un polinucleótido o polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la identificación, caracterización y/o purificación de moléculas que afectan a un proceso biológico asociado a la actividad de las serina proteasas.
7. Uso de un polinucleótido o polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para el desarrollo de moléculas para el tratamiento y diagnosis de estados patológicos, que implican la actividad de las serina proteasas.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, para la preparación de un vehículo para el tratamiento y/o prevención de estados patológicos que implican la actividad de las serina proteasas.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el vehículo es un medicamento, un producto alimenticio o un suplemento de alimento.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el proceso biológico de los estados patológicos se selecciona entre el grupo constituido por coagulación de sangre, fibrinólisis, reacciones inmunes, activación de complementos, recambio de matriz extracelular asociada a respuestas inflamatorias, migración de células y activación de prohormonas, metástasis de cáncer.
11. Un procedimiento de producción de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende la expresión de un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o un vector de acuerdo con la reivindicación 3 en un huésped adecuado y purificación del polipéptido obtenido.
12. Un procedimiento de detección de cepas probióticas, que comprende la selección de microorganismos con un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o un anticuerpo dirigido a un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, para la presencia de dicho ácido nucleico o dicho polipéptido y determinación de un Serpin en los microorganismos.
13. Un procedimiento para producir un microorganismo que expresa o sobreexpresa l Serpin codificado por un nucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, la transformación de un microorganismo con un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 y expresión del gen que codifica el polipéptido de Serpin.
14. Un alimento o producto alimenticio, que contiene un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, un vector de acuerdo con la reivindicación 3 o una célula huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.

ES 2 274 019 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Societé des Produits Nestlé S.A.	
5	<120> UN SERPIN EN BIFIDOBACTERIA	
	<130> 803BB/WO	
	<140> PCT/EP02/00956	
	<141> 2002-01-30	
10	<150> EP 01102 050.0	
	<151> 2001-01-30	
	<160> 2	
15	<170> PatentIn version 3.1	
	<210> 1	
	<211> 1395	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Bifidobacterium longum</i>	
	<400> 1	
25	atgagcgaac aactgatgga acagtaccgg ttgcgcggac aacgcaaatg ccgtaacgct	60
	tgtatcgccg ccatacgtgac agtagtgctt gtcccttgccg tcgcccggcg cgtatggctg	120
30	acggccggcg atggcagcgc attggttcgc aatatgttca agccgaaggc cacgcctgcc	180
	acgcagccgg tagtcaaacg caccgcaacc ttgcctacc gcaccgcacc ggaattcctg	240
	gcgatggaag ccggcgaccg aggcaccggc aatgtgaact actctcctgc ttcgatgtgg	300
35	atggcgcttg ccatacggcg gcaggcgcc aatggcacga cccgctcgca actgaacgaa	360
	ctgctgggct ccggttcgct gaccgatagc gactaccaat cgctgctaag ttcgatcaac	420
40	gggcaatatt cgggggcgaa atccgagatg agcgccgcga actcgtgtg gattgatgac	480
	gactactctc ttgccagcga ttaccaatcc accgtcaaga agatgttcga ggccgaagtc	540
	accacgttac cgttcgacga tcaggccgcc gccaaagtgt ccgattggat tgccaaqcat	600
45	acgaatggtt cgctcaagcc gaagatcacg ctgctgacc gtgaagtcct gtccatcctc	660
	aacaccgtct atgcggatgg ccgctggaag gatccgttcg aagagcagtc caccggcaac	720
50	ggcaccttcc acggcgaaac cggagatgct cagggtgccg tgatgcacca gacctcagc	780
	caaattggctt acggacatga tgagtacaac acttggcagc ggggtggagat tccgttcgac	840
	aacggcgcca atctggccat cgtgctgccg gccgaagggc atttcgacga gttggccggc	900
55	gatgccgaga agatcagttc ggcgttcggt acatgctcga cggcatccct tggcgagggc	960
	gcaatcgggt gcgccggga cagtatgcc ggctggggcg tctccgtcaa ctcggtcatg	1020
60	gtgaacgtca cgstaccgcg attcaccatc gacagcatgt tcgactcgga agccaccatc	1080
	aaggcatctc aaaaactggg ggtgaccgat gcgttcagtg caggcgacgc cgacttcacc	1140
65	aagatgatcg acaccggttc gcaaggcgag aacctgtata tcggttcgat tctgcaaggc	1200

ES 2 274 019 T3

acgcgcacgc aggtgaacga agccggcgcc aaggccatgt ccttcaccaa ggtcggcgca 1260
gactccgtta gcgcgccggt ggacaacgtc gagttcacgg tggatcgccc atttctgtat 1320
5 tcgtacgtca ccccgacgg cataccatta ttcacgggtg cgggtgcgca cctcggcgga 1380
gtcgggtggag aaaac 1395

10 <210> 2

<211> 465

<212> PRT

15 <213> *Bifidobacterium longum*

<400> 2

20 Met Ser Glu Gln Leu Met Glu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Gln Arg Lys
1 5 10 15

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

30 Ala Val Ala Gly Gly Val Trp Trp Thr Ala Gly Asp Gly Ser Ala Leu
35 40 45

35 Val Arg Asn Met Phe Lys Pro Lys Ala Thr Pro Ala Thr Gln Pro Val
50 55 60

40 Val Asn Ser Thr Ala Thr Phe Ala Tyr Arg Thr Ala Pro Glu Phe Leu
65 70 75 80

45 Ala Met Glu Ala Gly Asp Arg Gly Thr Gly Asn Val Asn Tyr Ser Pro
85 90 95

50 Ala Ser Met Trp Met Ala Leu Ala Ile Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gly
100 105 110

55 Thr Thr Arg Ser Gln Leu Asn Glu Leu Leu Gly Ser Gly Ser Leu Thr
115 120 125

60 Asp Ser Asp Tyr Gln Ser Leu Leu Ser Ser Ile Asn Gly Gln Tyr Ser
130 135 140

65 Gly Ala Lys Ser Glu Met Ser Ala Ala Asn Ser Leu Trp Ile Asp Asp
145 150 155 160

70 Asp Tyr Ser Leu Ala Ser Asp Tyr Gln Ser Thr Val Lys Lys Met Phe
165 170 175

75 Glu Ala Glu Val Thr Thr Leu Pro Phe Asp Asp Gln Ala Ala Ala Lys
180 185 190

ES 2 274 019 T3

Met Ser Asp Trp Ile Ala Lys His Thr Asn Gly Ser Leu Lys Pro Lys
195 200 205

5 Ile Thr Leu Arg Asp Arg Glu Val Leu Ser Ile Ile Asn Thr Val Tyr
210 215 220

10 Ala Asp Gly Arg Trp Lys Asp Pro Phe Glu Glu Gln Ser Thr Gly Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe His Gly Glu Ala Gly Asp Ala Gln Val Pro Met Met His
245 250 255

15 Gln Thr Phe Ser Gln Met Ala Tyr Gly His Asp Glu Tyr Asn Thr Trp
260 265 270

20 Gln Arg Val Glu Ile Pro Phe Asp Asn Gly Gly Asn Leu Ala Ile Val
275 280 285

25 Leu Pro Ala Glu Gly His Phe Asp Glu Leu Ala Gly Asp Ala Glu Lys
290 295 300

Leu Ser Trp Ala Phe Gly Thr Cys Ser Thr Ala Ser Leu Gly Glu Gly
305 310 315 320

30 Ala Met Gly Cys Ala Ala Asp Ser Met Pro Gly Trp Gly Val Ser Val
325 330 335

35 Asn Ser Val Met Val Asn Val Thr Leu Pro Arg Phe Thr Ile Asp Ser
340 345 350

Met Phe Asp Ser Glu Ala Thr Ile Lys Ala Phe Glu Lys Leu Gly Val
355 360 365

Thr Asp Ala Phe Ser Ala Gly Asp Ala Asp Phe Thr Lys Met Ile Asp
370 375 380

45 Thr Gly Ser His Gly Glu Asn Leu Tyr Ile Gly Ser Ile Leu Gln Gly
385 390 395 400

50 Thr Arg Ile Glu Val Asn Glu Ala Gly Ala Lys Ala Met Ser Phe Thr
405 410 415

Lys Val Gly Ala Asp Ser Val Ser Ala Pro Val Asp Asn Val Glu Phe
420 425 430

55 Thr Val Asp Arg Pro Phe Leu Tyr Ser Tyr Val Thr Pro Asp Gly Ile
435 440 445

60 Pro Leu Phe Ile Gly Ala Val Arg Asn Leu Gly Gly Val Gly Gly Glu
450 455 460

65 Asn
465