

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir metabolitos proteicos PEGilados con actividad antiviral, antibacteriana y de reparación de la estructura intestinal a partir de un cultivo bacteriano de *Bifidobacterium adolescentis*, el método es caracterizado porque comprende:
 - resuspender entre 50 a 1.000 μL de *B. adolescentis*, liofilizado o descongelado, en 0,5 a 10 mL de caldo MRS para formar una suspensión bacteriana;
 - incubar la suspensión bacteriana a una temperatura de entre 35 a 42°C, durante 24 a 48 h, en condiciones anaeróbicas, hasta que alcance una concentración de entre 1×10^7 a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para obtener el inóculo inicial;
 - cultivar el inóculo inicial en caldo MRS, incubar a una temperatura de entre 35 a 42°C, durante 24 a 48 h en condiciones anaeróbicas y agitación constante de entre 100 a 250 rpm, hasta que se encuentre en fase crecimiento exponencial o hasta que se encuentre en el final de una fase previa a la fase de crecimiento estacionaria para obtener la biomasa bacteriana;
 - separar la biomasa bacteriana del medio líquido por medio de centrifugación a una fuerza de entre 600 a 800 xg, durante 10 a 20 minutos, a una temperatura de entre 4 a 10°C, o, por medio de filtración o microfiltración, para obtener los metabolitos proteicos;
 - concentrar los metabolitos proteicos por medio de ultrafiltración con un ultrafiltro con punto de corte molecular de entre 1 kDa a 3 kDa, a una temperatura de entre 4 a 10°C;
 - tratar los metabolitos proteicos con polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular para obtener los metabolitos proteicos PEGilados precipitados, en donde el PEG de alto peso molecular comprende una concentración de entre 8% a 12% p/v, en donde la precipitación de los metabolitos proteicos tratados con PEG comprende agitación continua de entre 35 y 60 rpm durante 12 a 18 h, a una temperatura de 4 a 10°C;

- obtener los metabolitos proteicos PEGilados por medio de centrifugación a fuerza de 12.000 a 20.000 xg durante 20 a 40 minutos a una temperatura de 4 a 10°C;

en donde los metabolitos proteicos PEGilados tienen un tamaño de entre 158 Da a 251,5 KDa, tienen actividad antiviral y capacidad de reparación de las uniones estrechas celulares y del citoesqueleto de células intestinales de mamíferos y aves.

2. El método según la reivindicación 1, en donde las condiciones anaeróbicas comprenden suministrar al sistema una mezcla de nitrógeno gaseoso y dióxido de carbono en proporción de 70 a 90 % de nitrógeno gaseoso y 30 a 10% de dióxido de carbono, con un caudal de entre 0,5 a 1 L/min.
3. El método según la reivindicación 1, en donde antes de cultivar el inóculo inicial en caldo MRS se realizan las siguientes etapas:
 - transferir 0,1 mL de suspensión de *B. adolescentis* a un medio MRS sólido mediante siembra masiva e incubar a una temperatura de entre 35 a 42°C durante 24 a 48h en condiciones anaeróbicas.
 - verificar la viabilidad celular mediante recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL);
 - confirmar identidad y pureza del cultivo con un sistema o estuche comercial basado en actividad bioquímica específica o un sistema equivalente para la identificación de la especie *B. adolescentis*.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el paso de cultivar el inóculo inicial en caldo MRS comprende cultivar dicho inóculo inicial en un frasco, Erlenmeyer o tubo.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el paso de cultivar el inóculo inicial en caldo MRS comprende cultivar dicho inóculo inicial en un tanque.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el paso de cultivar el inóculo inicial en caldo MRS comprende cultivar dicho inóculo inicial en un biorreactor.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el paso de separar la biomasa bacteriana del medio líquido comprende separar la biomasa bacteriana del medio líquido por medio filtración con malla de retención de biomasa, o microfiltración con poro de entre 0,22 μm a 0,45 μm .
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el paso de obtener los metabolitos proteicos PEGilados comprende eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en PBS 1X estéril a un factor de concentración de 20 a 50 con respecto al cultivo.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además almacenar los metabolitos proteicos PEGilados concentrados a una temperatura de entre 4 a 10°C.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además tomar una alícuota de los metabolitos proteicos PEGilados obtenidos para determinar la concentración final de proteínas.
11. El método según la reivindicación 10, que se determina con el método del ácido bicinconínico (BCA).

12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que además comprende validar la presencia de los metabolitos proteicos PEGilados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas entre el 5 y 15 % y detectar las proteínas con tinción de nitrato de plata.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que además comprende evaluar *in vitro* los efectos citotóxicos de los metabolitos proteicos PEGilados mediante evaluación de la viabilidad celular por MTT o XTT o equivalente, y evaluar *in vitro* marcadores de muerte celular como para apoptosis o necrosis en células intestinales humanas C2BBE1, CaCo2, HT-29, T84, HCT-8, SW480, INT-407, HIEC-6, o similar, otras células intestinales de cerdo como IPEC-J2 o similar y células de riñón de mono verde MA-104 o células de riñón de cerdo PK-15 o similar a concentraciones de 500 µg/mL y 0,125 µg/mL.
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende evaluar *in vitro* la actividad antiviral directa o virucida de los metabolitos proteicos PEGilados contra rotavirus y astrovirus a concentraciones de 500 µg/mL y 0,125 µg/mL mediante inmunocitoquímica o ensayo de focos fluorescentes o Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) en células intestinales humanas como C2BBE1 o las incluidas en la reivindicación 13 y células de riñón de mono verde MA-104.
15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende evaluar *in vitro* la actividad post-infección de los metabolitos proteicos PEGilados contra rotavirus y astrovirus a concentraciones entre 500 µg/mL y 0,125 µg/mL mediante inmunocitoquímica o ensayo de unidades formadoras de placas o ensayo de focos fluorescentes o Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) en células intestinales humanas como C2BBE1 o las incluidas en la reivindicación 13 y células de riñón de mono verde MA-104.

16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende evaluar *in vitro* la actividad de reparación estructural celular producida por los metabolitos proteicos PEGilados contra rotavirus y astrovirus post-infección a concentraciones de 500 µg/mL y 0,125 µg/mL mediante inmunocitoquímica o ensayo de focos fluorescentes o Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) en células intestinales humanas como C2BBE 1 o células de riñón de mono verde MA-104 o las incluidas en la reivindicación 13.