

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 334 083**

21 Número de solicitud: 200703165

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **28.11.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**04.03.2010**

71 Solicitante/s:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Figueras Huerta, Antonio;  
Novoa García, Beatriz;  
Dios Vidal, Sonia;  
Gestal Mateo, Camino y  
Costa Portela, María del Mar**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

54 Título: **Método para la identificación de polipéptidos antibacterianos y antivirales obtenidos de *Mytilus edulis*.**

57 Resumen:

Método para la identificación de polipéptidos antibacterianos y antivirales obtenidos de *Mytilus edulis*.

La invención proporciona un método para la identificación de polinucleótidos que codifican las formas precursoras de polipéptidos de las familias de las miticinas y de las mitilinas. La invención proporciona igualmente las miticinas y mitilinas identificadas con dicho método, así como su uso como agentes antibacterianos y antivirales.

ES 2 334 083 A1

## DESCRIPCIÓN

Método para la identificación de polipéptidos antibacterianos y antivirales obtenidos de *Mytilus edulis*.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se relaciona con un método para la identificación de polinucleótidos que codifican las formas precursoras de polipéptidos de las familias de las miticinas y de las mitilinas, así como a las miticinas y mitilinas identificadas con dicho método y a su uso como agentes antibacterianos y antivirales.

10

**Antecedentes**

El cultivo de moluscos bivalvos supone una de las mayores producciones de la acuicultura en la Unión Europea llegando a constituir más del 70% de la producción mundial. Concretamente, el cultivo del mejillón (*Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis*, fundamentalmente) supera las 500.000 toneladas de producción cada año (593.000 toneladas en 2003 según datos de la FAO). A pesar de la elevada producción de estos moluscos, y de la existencia de enfermedades que afectan gravemente a su producción, con las importantes pérdidas económicas que ello conlleva, poco se conoce de cómo responden estos organismos a la enfermedad. Los bivalvos, al igual que el resto de los invertebrados, carecen de un sistema inmune adaptativo específico y sólo poseen un sistema inmune innato que actúa independientemente de la naturaleza del estímulo, lo que imposibilita el uso de vacunas al carecer de memoria inmunológica. Con estas limitaciones, el control de las enfermedades se basaba fundamentalmente en el diagnóstico del agente patógeno y en el buen manejo de los stocks.

Recientemente se han descrito en mejillón una serie de pequeños péptidos con actividad antimicrobiana, capaces de reducir el crecimiento de varios microorganismos analizados. La patente estadounidense US6911524 y Mitta, G. *et al.* (Eur. J. Biochem., 265:71-78) describen dos péptidos aislados de la hemolinfa de *Mytilus galloprovincialis*, denominados miticina A y B, que muestran actividad bactericida, fungicida y antiparasitaria frente a ciertos patógenos. Charlet, M. *et al.* (J Biol. Chem., 1996, 271:21808-21813) han descrito dos polipéptidos aislados de la hemolinfa de *Mytilus edulis* denominados mitilinas A y B que muestran actividad bactericida. Mitta, G. *et al.* (J. Biol. Chem., 2000, 275:12954-12962) han descrito tres nuevas isoformas de las mitilinas denominadas mitilinas C, D y G1 que también muestran actividad bactericida y fungicida.

Sin embargo, la puesta en práctica de dichos péptidos como agentes para el control de patógenos requiere de disponer de cantidades suficientes de ellos. Esto sólo es posible mediante la expresión de los péptidos de forma recombinante en células heterólogas, ya que la purificación usando métodos convencionales a partir de los extractos de hemolinfa sólo produce cantidades muy limitadas de los mismos. Con el fin de poner a punto sistemas para la expresión recombinante de estos péptidos, es necesario disponer de la correspondiente secuencia de ADNc. La forma habitual para obtener la secuencia de ADNc para este tipo de péptidos consiste en realizar un screening de una biblioteca de ADNc obtenida de hemolinfa mediante PCR usando cebadores degenerados obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida de la proteína purificada para así amplificar el ADNc. Sin embargo, dado que estos péptidos se sintetizan en forma de precursores para después convertirse en péptidos maduros mediante su procesamiento post-traduccional, la amplificación del ADNc usando cebadores obtenidos a partir de la secuencia del péptido maduro permite obtener únicamente un ADNc parcial que codifica la secuencia del péptido maduro pero que no se corresponde a la secuencia nucleotídica completa que codifica para el precursor de la proteína. En estos casos, es necesaria una segunda ronda de screening usando el ADNc parcial obtenido en el primer screening como sonda para identificar mediante hibridación en una segunda ronda de screening el ADNc completo de las miticinas y mitilinas (véase Mitta, G. *et al.*, 1999, Eur. J. Biochem., 265:71-78).

Así, existe una necesidad en el arte de métodos más sencillos que permitan la obtención de ADNcs que codifiquen las secuencias completas de los precursores de las mitilinas y miticinas con el fin de simplificar el proceso global de obtención por vía recombinante.

Los estudios realizados hasta la fecha con estas formas ya patentadas revelan la existencia de actividad frente a bacterias Gram positivas fundamentalmente, sin apreciarse especificidad de patógeno. Por tanto, es necesario trabajar en el desarrollo de nuevos compuestos alternativos y eficaces, que reduzcan al mínimo posible los problemas antes expuestos, y que puedan ser incluidos dentro de estrategias integradas para el control de las enfermedades durante el cultivo de estos moluscos.

60 **Compendio de la invención**

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de un ADNc que codifica el precursor de una miticina o una mitilina que comprende

- (i) poner en contacto un mejillón un agente inmunogénico,
- (ii) preparar librerías de ADNc de mejillones tratados con el agente inmunogénico

65

(iii) efectuar una sustracción de la librería obtenida de los mejillones tratados con una preparación de ácidos nucleicos de mejillones controles y

(iv) aislar los ADNcs específicos de mejillones tratados con el agente inmunogénico.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un ADNc identificado mediante un método de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende un ácido nucleico de la invención.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico o una construcción génica de la invención que está operativamente acoplado con una secuencia que regula la expresión de dicho polinucleótido o de dicha construcción génica.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora que contiene una construcción génica o un vector de acuerdo a la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido codificado por un ADNc de la invención.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un polipéptido de la invención que comprende transformar una célula con un vector de la invención y recuperar el polipéptido del interior celular o del medio de cultivo.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un polipéptido de la invención que comprende inyectar intramuscularmente en un mejillón un agente inmunogénico y recuperar posteriormente de la hemolinfa uno o varios de los polipéptidos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido de la invención.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende al menos un polipéptido de la invención y un carrier farmacéuticamente aceptable.

35 En otro aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido de la invención o con una composición farmacéutica de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polipéptido de la invención o de una composición de la invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad infecciosa.

#### 40 **Descripción detallada de la invención**

Los autores de la presente invención han conseguido desarrollar un método para la identificación de mitilinas y miticinas que permite obtener en un solo paso la secuencia completa del ADNc que codifica los precursores de dichos péptidos, facilitando así la posterior obtención de dichos péptidos de forma recombinante. Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de miticinas y mitilinas (de aquí en adelante “el método de la invención”) que comprende las etapas de

(i) inyectar intramuscularmente en un mejillón un agente inmunogénico,

(ii) preparar librerías de ADNc de mejillones tratados con el agente inmunogénico

50 (iii) efectuar una sustracción de la librería de cADN obtenida de los mejillones tratados con una población de ácidos nucleicos obtenida a partir de mejillones controles y

(iv) aislar los ADNcs específicos de mejillones tratados con el agente inmunogénico.

55 Por “miticina” se entiende, en el contexto de la presente invención, una proteína que comprende una de las secuencias definidas en SEQ ID NO:1 a 16 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

60 Por “mitilina” se entiende, en el contexto de la presente invención, una proteína que comprende una de las secuencias definidas en SEQ ID NO:17 a 19 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

65 Por “variante funcionalmente equivalente” se entiende, en el contexto de la presente invención, toda proteína que se puede obtener a partir de las mitilinas o miticinas anteriormente indicadas mediante la sustitución, delección o inserción de uno o mas aminoácidos y que mantiene sustancialmente la función de la proteína original. La determinación de la función de las miticinas/mitilinas se puede llevar a cabo usando métodos convencionales ampliamente conocidos para el experto en la materia, tales como los ensayos de actividad antimicrobiana, antifúngica y antiparasitaria descritos en US6911524 para las miticinas o los ensayos de actividad antimicrobiana descritos en Charlet, M. *et al.* (J. Biol. Chem., 1996, 271:21808-21813) para las mitilinas.

## ES 2 334 083 A1

Por "precursor de una mitilina o miticina" se entiende toda proteína cuya secuencia comprende la secuencia de la mitilina o miticina y una o más regiones adicionales que mantienen la proteína en su forma inactiva y que se eliminan mediante procesamiento proteolítico de forma post-traducciona para generar la forma madura y activa de las miticinas/mitilinas.

5 En el primer paso del método de la invención, se procede a la administración en un mejillón de un agente inmunogénico. Preferiblemente, el agente inmunogénico se selecciona del grupo de un cóctel de bacterias muertas, poli I:C y una mezcla de ambos.

10 En el segundo paso del método de la invención, se prepara una librería de ADNc a partir de los mejillones que se han tratado con el agente inmunogénico. Preferiblemente, la librería de ADNc se prepara a partir de los hemocitos. El proceso de obtención de una librería de ADNc de una célula, órgano u organismo de interés comienza por la preparación de ARNm de la célula en la que se expresen las miticinas/mitilinas, como por ejemplo, los hemo-  
15 citos o la hemolinfa. El mRNA se puede aislar usando métodos convencionales tales como mediante la extracción usando fenol/clorofomo, fenol/SDS o guanidina, en cuyo caso es posible la purificación previa del ARN mediante en centrifugación en gradiente de cloruro de cesio, gradientes descritos en Sambrook, J. *et al* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) (vease capítulo 7)) y Ausubel, F (Current Protocols in Molecular Biology) (Units 4.1-4.4). Una vez que se ha aislado el ARN total del tejido de mejillón, es preferible obtener la fracción poliA<sup>+</sup>, que contiene los ARNm. Típicamente, el aislamiento de  
20 los ARN poliA<sup>+</sup> se efectúa mediante purificación por afinidad usando matrices conjugadas con oligo(dT), que permite retener los ARN mediante su hibridación con las colas de poladenina de los ARNm. La purificación de ARN poliA<sup>+</sup> en matrices de oligo(dT) se puede llevar a cabo en columna o en suspensión. En el primer caso, la matriz de oligo(dT) se empaqueta en una columna cromatográfica sobre la cual se añade el ARN celular total, de forma que el ARNm queda retenido mientras que el resto de ARN no poliA<sup>+</sup> eluye de la columna. EL ARNm se eluye posteriormente lavando la columna con una solución que permite romper la interacción entre el ARN poliA<sup>+</sup> y las matrices de oligo(dT), como por ejemplo una mezcla de EDTA 2 mM y SDS al 0.1%. En caso de que la purificación del ARN poliA<sup>+</sup> se  
25 lleve a cabo en suspensión, el procedimiento es esencialmente idéntico al método en columna con la diferencia de la separación del ARN no poliA<sup>+</sup> que no se ha unido a la matriz de oligo(dT) del ARNm poliA<sup>+</sup> se consigue mediante centrifugación de las partículas de oligo(dT) lo que resulta en la sedimentación de las partículas que contienen el  
30 ARNm poliA<sup>+</sup> unido mientras que el ARN no poliA<sup>+</sup> permanece en el sobrenadante. La elución del ARNm poliA<sup>+</sup> se lleva a cabo mediante lavado de las partículas con una solución del tipo EDTA 2 mM y SDS al 0.1%. El ARNm es posteriormente precipitado en presencia de 2.5 volúmenes de etanol para eliminar el SDS procedente de la solución de elución.

35 Una vez que se dispone de una preparación purificada de ARNm, este se pone en contacto con un cebador que puede ser un oligonucleótido que incorpora una región de poli(dT) en su extremo 3' o una mezcla de cebadores de secuencia aleatoria en presencia de una transcriptasa inversa carente de actividad RNase H (por ejemplo, las transcriptasas reversas del virus de la leucemia murina de Moloney, del virus de la mieloblastosis aviar, del virus de la inmunodeficiencia humana, del virus de la inmunodeficiencia en simios, del virus respiratorio sincitial, del virus es-  
40 pumoso humano, del virus de la leucemia bovina, del virus linfotrófico T humano tipo I, o la transcriptasa reversa R2 de *Bómbix mori*). Si se usa un cebador que contiene una región de poli(dT), el ADNc comienza a formarse por el extremo 3' del ARNm que corresponde a la cola de poliadeninas. Por el contrario, si se usa una mezcla de cebadores de secuencia aleatoria, se obtendrán moléculas de ADNc correspondientes a todas las regiones del ARNm, por lo que esta es la técnica de elección en caso de que se deseen obtener poblaciones de ADNc enriquecidas en los extremos 5'  
45 de los ARNm correspondientes.

La transcriptasa reversa extiende el cebador o los cebadores usando como molde la secuencia del ARNm creando una molécula de ADN de cadena sencilla cuya secuencia viene dictada por la secuencia del ARNm que se ha usado como molde y al cual permanece unida formando un híbrido ARNm/ADNc. La siguiente etapa consiste en la elimina-  
50 ción de la cadena de ARNm del híbrido con la simultánea síntesis de la segunda cadena de ADNc. Para ello, el híbrido ARNm/ADNc se pone en contacto con una RNasa H, con la ADN polimerasa de *E. coli* y con la ADN ligasa de *E. coli*. De esta forma, la RNasa H introduce cortes en la cadena de ARNm que son reparados por la ADN polimerasa de *E. coli* a la vez que, gracias a su actividad exonucleasa 3'-5', elimina los restos de ARNm y los reemplaza por una cadena nueva de ADNc, que son ligados a los fragmentos contiguos por medio de la actividad de la ADN ligasa,  
55 formándose así el ADN de doble cadena o ADNc. El ADNc resultante es tratado para eliminar nucleótidos sobrantes en los extremos 5' y 3'. Alternativamente, si la síntesis de la primera cadena de ADNc se lleva a cabo usando una transcriptasa reversa que posee actividad RNasa H, el producto resultante no es un híbrido ADNc/ARNm sino una cadena sencilla de ADNc.

60 Una vez que se ha obtenido una población de ADNc que representa los ARNm que aparecen en células de organismos que se han estimulado con un agente inmunogénico, es necesario incorporar dicha población en un vector de clonación para así poder amplificar la población de ADNc. El experto en la materia apreciará que existen múltiples alternativas para dicho propósito. Preferiblemente, la población de ADNc una nucleasa y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* para así eliminar nucleótidos no apareados en los extremos 5' y 3' de la secuencia y  
65 obtener moléculas de extremos romos. Posteriormente, las moléculas de ADNc de extremos romos son tratadas con una ADN metilasa (por ejemplo la metilasa EcoRI) en presencia de un donante de grupos metilo (normalmente S-adenosil metionina). A continuación, las moléculas de ADNc de extremos romos y metiladas se pueden ligar a adaptadores o enlazadores (linkers) que contienen sitios diana para la enzima de restricción cuya metilasa se utilizó en la

etapa anterior (por ejemplo la endonucleasa de restricción EcoRI). Una vez que las moléculas de ADNc se han ligado a los adaptadores, se digieren con la enzima de restricción correspondiente y se ponen en contacto con un vector de clonación linearizado mediante digestión con la misma enzima en presencia de una ADN ligasa (por ejemplo, la ADN ligasa del fago T4, la ADN ligasa de Taq o la ADN ligasa de *E. coli*) para dar lugar a la recircularización de los vectores  
 5 conteniendo los insertos de ADNc en su interior. La población de moléculas de ADNc ligadas a los adaptadores puede ser fraccionadas mediante cromatografía de exclusión en gel con el fin de seleccionar aquellos insertos de mayor peso molecular.

En el tercer paso del método de la invención, una vez que se dispone de una genoteca de ADNc correspondiente a la  
 10 población de ARNm presente en una célula en una condición determinada, se efectúa una “sustracción” de la genoteca obtenida de células estimuladas (población (+)) con una población de ácidos nucleicos obtenidos de las mismas células en ausencia de dicho estímulo (población (-)) de forma que se eliminan de la genoteca aquellas secuencias cuya expresión ocurre indistintamente en presencia y en ausencia de dicha condición. Para ello la población de ácidos nucleicos usada para efectuar la sustracción puede ser una preparación de ARNm aislada de mejillones controles o,  
 15 alternativamente, una preparación de ADNc obtenida a partir de dicho mARN.

En el caso de que se disponga de una población de ADNc de cada una de las poblaciones celulares, se pueden usar métodos ampliamente conocidos para el experto en la materia tales como los métodos descritos en Ausubel, F.M, Current Protocols in Molecular Biology, Unidad 25B.1). En caso de que se disponga de una preparación de ADNc de  
 20 la muestra en la que se encuentran los genes de expresión diferencial y una preparación de ARNm de la muestra en la que no se expresan dichos genes, también es posible llevar a cabo una sustracción mediante métodos conocidos para el experto en la materia como por ejemplo (i) hibridación del ARNm al ADNc desnaturalizado y separación de los híbridos ADNc/ARNm en base a su capacidad de unión a columnas de hidroxipatito a 68°C, (ii) hibridación de ARNm a una genoteca de ADNc expresada en fagemidos de cadena sencilla y (iii) hibridación de ARNm a ADNc y  
 25 separación de los híbridos mediante unión a oligo(dT)-latex.

Otros métodos adecuados para el aislamiento de genes expresados de forma diferencial incluyen el muestreo aleatorio entre dos o más poblaciones celulares en el que los clones se seleccionan al azar de una biblioteca de ADBc), hibridación diferencial (en el que sondas obtenidas de los ARNms de los dos poblaciones celulares que se comparan  
 30 y se usan para realizar un screening de una biblioteca de ADNc y para aislar aquellos clones que hibridan a una sonda pero no a otra y presentación diferencial (differential display) en el que cebadores parcialmente aleatorios se usan para amplificar un subconjunto de ARNms que se expresan en una célula determinada, los fragmentos obtenidos se separan en un gen de acrilamida y las bandas obtenidas de distintas muestras se comparan.

En una forma preferida de realización, la sustracción se lleva a cabo mediante la técnica de hibridación mediante supresión de sustracción (suppression subtractive hybridization o SSH). En este método se parte de ADNc de cadena  
 35 doble de ambas poblaciones, los ADNc se digieren con endonucleasas de restricción que tienen un diana de corte de 4 pares de bases. A continuación, los fragmentos resultantes se ligan a dos conjuntos diferentes de adaptadores (a1/a2 y b1/b2). Los ADNcs se amplifican con cebadores adecuados (a1 o b1) para dar lugar a las poblaciones de ADN A0 y B0. A continuación, se llevan a cabo dos conjuntos de sustracciones (A0-B0 y B0-A0), lo que permite obtener los genes expresados diferencialmente en la población A y los genes expresados diferencialmente en la población B. En cada caso, los ADNcs (+) y (-) se marcan con una pequeña cantidad de [<sup>32</sup>P] dCTP y el ADNc de la población (-) se marca con biotina durante la síntesis, bien mediante la incorporación de biotina-11-dUTP durante la reacción de PCR, bien mediante biotilación del producto de PCR o bien mediante el uso de cebadores biotilados. Los ADNcs  
 40 (+) y (-) se mezclan en una relación 1:20, se desnaturalizan y se realinean. Los híbridos (-)/(-) y (+)/(-) se eliminan mediante tratamiento con estreptavidina y extracción con fenol. El resultado es un enriquecimiento en secuencias que aparecen con mayor frecuencia en la población (+). Opcionalmente, se pueden llevar a cabo rondas adicionales de sustracción. Una vez que las reacciones de sustracción se han completado, los ADNcs se donan en los vectores apropiados. Preferiblemente, la sustracción se lleva a cabo usando kits comerciales tales como el kit PCR-Select  
 45 cDNA subtraction kit (Clontech).

Usando el método de la invención, es posible la identificación de los ADNcs correspondientes a los ARNms que se inducen en hemocitos de mejillón cuando este es tratado con una composición inmunogénica. Así, en otro aspecto,  
 50 la invención se refiere a un ADNc que se ha aislado usando el método de la invención. Preferiblemente, los ADNc aislados usando el método de la invención codifican para las formas precursores de mitilinas y miticinas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende, además del ácido nucleico de la invención, elementos que regulan la expresión de dicho gen. Dichos elementos reguladores incluyen promotores y potenciadores. Los promotores se encuentran típicamente posicionados en posición 5' con respecto al sitio de iniciación de la transcripción o traducción. Los potenciadores son capaces de influenciar la expresión de genes cuando se encuentran en posición 5' o 3' con respecto al ADNc o cuando se encuentran formando parte de un intrón. Secuencias reguladoras incluyen, además de promotores, secuencias que facilitan la traducción, señales de procesamiento para los intrones, codones de terminación, secuencias señales, sitios internos de unión al ribosoma (IRES) y señales de poliadenilación.  
 65

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la invención o con una construcción génica de la invención que está operativamente acoplado con una secuencia que regula la expresión de dicho polinucleótido o de dicha construcción génica. El experto en la materia advertirá que el

## ES 2 334 083 A1

tipo de vector adecuado para la expresión de los ácidos nucleicos y construcciones génicas de la invención dependerá del organismo en el que se desee expresar el ADNc de la invención.

Así, para la expresión en organismos procariotas, la invención contempla el uso de vectores del tipo de pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28. Para la expresión en levaduras, vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares. Para la expresión en baculovirus, la invención contempla el uso de vectores de la serie pAC y de la serie pVL. Para la expresión en plantas, la invención contempla el uso de vectores del tipo en los que la expresión de los polinucleótidos de la invención puede estar dirigida por promotores virales del tipo de los promotores 35S y 19S del CaMV, que pueden ser usados opcionalmente en combinación con la secuencia omega de TMV. Alternativamente, se puede usar el promotor del gen que codifica para la subunidad pequeña de RUBISCO, el promotor del gen de la nopalina sintetasa o promotores regulados por estrés térmico y similares.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula o un organismo hospedador que contiene una construcción génica de la invención o un vector tal que definido en la invención. Cualquier tipo de organismo hospedador conocido para el experto en la materia puede ser usado en la presente invención, tales como una cepa bacteriana (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y similares), una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y similares), una planta transgénica (dicotiledoneas o monocotiledoneas), una célula de insecto, por ejemplo, baculovirus, una célula de mamífero (células COS, CHO, C127, HeLa y similares) y un transgénico no humano (por ejemplo, un ratón, una vaca, una cabra, un conejo, un cerdo, etc.).

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un polipéptido según la invención que comprende transformar una célula con un vector según la invención y recuperar el polipéptido del interior celular o del medio de cultivo. Las proteínas de la invención se pueden expresar usando una variedad de sistemas de expresión. Normalmente, los péptidos pueden ser recuperados del medio de cultivo puesto que las mitocinas y mitilinas contienen una secuencia señal que dirige la expresión de las proteínas al medio extracelular. En la presente invención, se pueden usar células hospedadoras procariotas, más concretamente, bacterias tales como *E. coli* y *B. subtilis* transformadas con un plásmido, cósmido o bacteriófago que contiene el gen del precursor de la miticina y/o mitilina, levaduras tales como *Saccharomyces* y *Pichia*, transformadas con vectores de expresión en levaduras, células de insecto infectadas con vectores virales capaces de infectar dichas células (baculovirus), células de plantas infectadas con vectores virales específicos de plantas (virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco) o transformadas con vectores plasmídicos (por ejemplo, el plásmido Ti) o células de mamíferos (por ejemplo células COS, CHO, BHK, 293, 3T3, HeLa, C127, Hep G2 y similares).

El experto en la materia advertirá que la invención incluye la expresión de los ADNcs tal y como se han aislado usando el método de la invención pero que también es posible la modificación de dichos ADNcs de forma que la secuencia de la miticina y/o mitilina sea ligada a una secuencia heteróloga que sea traducida en el sistema de expresión anteriormente indicado. Dicha secuencia heteróloga puede tener utilidad tanto para la purificación de la proteína como para su identificación si existen anticuerpos específicos para ella. Dichas secuencias heterólogas incluyen aquellas que codifican para la glutatión-S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa (MBP), tioredoxina (Trx), péptido de unión a calmodulina (CBP), hexahistidina, FLAG, c-myc y hemaglutinina. GST, MBP, Trx, CBP y 6-His permiten la purificación de la proteína asociada a ellas usando glutatión, maltosa, óxido de fenilarsina, calmodulina o metales inmovilizados, respectivamente. FLAG, c-myc y hemaglutinina permiten la purificación mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos monoclonales y policlonales específicos que reconocen los distintos epítopos.

Puesto que las mitocinas y mitilinas se sintetizan en forma de precursor que contiene, además de la forma madura, un primer péptido en la región N-terminal y un segundo péptido en la región C-terminal que deben ser eliminados durante su maduración intracelular, el experto en la materia advertirá que la secuencia heteróloga para su localización/purificación debe estar situada en la secuencia de la mitilina/miticina adyacentemente a la forma madura del polipéptido, bien asociado a través de su extremo N-terminal como asociado a través de su extremo C-terminal. Alternativamente, las secuencias que codifican para las mitilinas y/o mitocinas y las secuencias que codifican para las proteínas o péptidos heterólogos pueden estar separadas por una secuencia heteróloga adicional que codifica para un sitio de reconocimiento para una proteasa, de forma que la secuencia heteróloga pueda ser eliminada tras la purificación de la proteína de fusión.

Usando el método objeto de la invención, los autores han puesto de manifiesto que, de forma sorprendente, el repertorio de péptidos con actividad antibacteriana presentes en hemolinfa de mejillón es muy superior a lo que se conocía hasta la fecha, puesto que los autores han identificado la existencia de 16 nuevas formas de mitocinas y 3 nuevas formas de mitilinas, todas ellas distintas a las descritas previamente. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido seleccionado del grupo de:

- (i) un polipéptido que comprende una de las secuencias definidas en SEQ ID NO:1 a 19.
- (ii) una variante del polipéptido según (i) que muestra una identidad en la secuencia aminoacídica de al menos 90% con los polipéptidos definidos en las secuencias de 1 a 16, y
- (iii) una variante del polipéptido según (ii) que muestra una identidad en la secuencia aminoacídica de al menos 66% con los polipéptidos definidos en las secuencias 17 a 19.

## ES 2 334 083 A1

Según se entiende en el contexto de la presente invención, una variante de un polipéptido según se define en las secuencias de SEQ ID NO:1 a 19 es todo aquel péptido que se puede obtener a partir de la secuencias 1 a 16 mediante sustitución, inserción o delección de uno o más amino ácidos. En el caso de las variantes por sustitución, la sustituciones son preferentemente sustituciones conservativas, esto es, los aminoácidos se sustituyen por otros con características similares en cuanto a la propiedades de su cadena lateral. Así, sustituciones conservativas incluyen sustituciones dentro de los grupos de amino ácidos según la tabla 1.

Tipo de cadena lateral	Amino ácido
Alifática apolar o ligeramente polares	Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
Polar con carga neutra positiva	His, Arg, Lys
Polar con carga neutra negativa y las amidas correspondientes	Asp, Asn, Glu, Gln
Aromática	Phe, Tyr, Trp
Alifática de gran tamaño y apolar	Met, Leu, He, Val, Cys

Adicionalmente, uno ó más de los amino ácidos de las variantes de la invención pueden estar sustituidos por amino ácidos no convencionales naturales o sintéticos como por ejemplo, beta-amino ácidos, ácido 2-aminoadípico, alpha-asparagina, ácido 2-aminobutanoico, ácido 2-aminocáprico, alpha-glutamina, alpha-metilalanina, ácido 2-aminopimélico, ácido gamma-amino-beta-hidroxibenzenopentanoico, ácido 2-aminosubérico, 2-carboxiazetidina, beta-alanina, ácido beta-aspartico, ácido 3,6 diaminohexanoico, ácido butanoico, ácido 4-amino 4-amino-3-hidroxi butanoico, ácido gamma-amino-beta-hidroxiciclohexanopentanoico, N5-aminocarbonilornitina, 3-sulfoalanina, ácido 2,4 diaminobutanoico, ácido diaminopimélico, ácido 2,3 diaminopropanoico, ácido 2,7 diaminosubérico, S-etiltiocisteina, ácido gamma-glutámico, ácido gamma-carboxiglutámico, ácid pirogultámico, homarginina, homocisteina, homohistina, homoserina, ácido 2-hidroxiisovalérico, ácid 2-hidroxipentanoico, 5-hidroxisilina, 4-hidroxipriolina, 2-carboxioctahidroindol, 3-carboxiisquinolina, isovalina, ácido 2-hidroxipropanoico, ácido mercaptoacético, ácid mercapto-butanoico, 4-metil-3-hidroxiprolina, ácido mercaptopropanoico, norleucina, nortirosina, norvalina, ornitina, penicilamina, 2-fenilglicina, 2-carboxipiperidina, sarcosina, 1-amino-1-carboxiciclopentano, statin, 3-tienilalanina, epsilon-N-trimetilisina, 3-tiazolialanina, ácido alpha-amino-2,4-dioxopirimidinapropanoico.

Adicionalmente, la invención contempla variantes de los péptidos de la invención en los que uno o mas aminoácidos han sufrido modificaciones en su cadena lateral. Ejemplos de modificaciones de cadena lateral contempladas en la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como alquilación, amidinación, acilación, carbomoiilación, trinitrobencilación, piridoxilación, modificaciones del grupo guanidino de los restos de arginina consistentes en la formación de condensados heterocíclicos; modificaciones de los grupos carboxilo mediante amidación, modificaciones de tirosinas mediante metoxilación, modificación del anillo imidazólico de la histidina mediante alquilación o N-carboxietilación, modificaciones de la prolina mediante hidrixliación en posición 4. Alternativamente, la invención contempla variantes de los péptidos de la invención mediante glicosilación, es decir, la adición de grupos de glicano bien en la cadena lateral serine y/o treonina (O-glicosilación) o en la cadena lateral asparagina y/o glutamina (N-glicosilación). Los glicanos que pueden incorporarse a los polipéptidos de la invención incluyen un número variable de unidades glucídicas (mono-, di-, tri, tetrasacáridos y sucesivos). Los monosacáridos que forman en glicano incluyen D-alosa, D-altrosa, D-glucosa, D-manosa, D-gulosa, D-idosa, D-galactosa, D-talosa, D-galactosamina, D-glucosamina, D-N-acetylglucosamina, D-N-acetylgalatosamina, D-fucosa o D-arabinosa.

Alternativamente, la invención contempla variantes de los polipéptidos de la invención en los que se incluyen los estereoisómeros D de al menos uno de los aminoácidos que constituyen la cadena peptídico para dar así lugar a los isómeros retro-inversos.

En otra forma de realización, la invención contempla peptidomiméticos de los polipéptidos de la invención, es decir, variantes en las que uno o más de los enlaces peptídicos ha sido reemplazado por un tipo alternativo de enlace covalente. Dichos peptidomiméticos se caracterizan por mostrar una mayor estabilidad al ser más resistentes a proteasas. Modificaciones del esqueleto peptídico incluyen la sustitución o la inserción en los elementos del enlace peptídico (-NH-, -CH-, -CO-) de grupos tales como -O-, -S-, -CH2 en lugar de -NH-, -N-, -C-alkil p -BH- en lugar de -CHR y -CS-, -CH2-, -SON-, -P=O(OH)- o -B(OH)- en lugar de -CO-. Adicionalmente, es posible aumentar la estabilidad de los péptidos de la invención usando grupos que bloquen el extremo N-terminal tales como t-butiloxicarbonil, acetyl,

succinil, metoxisuccinil, suberil, adipil, dansil, benciloxicarbonil, fluorenilmetoxicarbonil, metoxiadipil, metoxiadipil, metoxisuberil y 2,3-dinitrofenil. Alternativa p simultáneamente, es posible modificar el extremo C-terminal de los péptidos mediante amidación.

5 La determinación del grado de identidad entre las variantes y los polipéptidos definidos en las secuencias 1 a 19 se lleva a cabo usando métodos y algoritmos informáticos ampliamente conocidos para el experto en la materia. Preferentemente, la identidad entre dos secuencias de amino ácidos se determina usando el algoritmo BLASTP (BLASTManual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 21 5: 403-410 (1990). Preferiblemente, los polipéptidos objeto de la invención muestran una identidad de secuencia con los polipéptidos definidos en las secuencias de SEQ ID NO:1 a 19 de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un polipéptido de la invención que comprende transformar una célula con un vector según de la invención y recuperar el polipéptido del interior celular o del medio de cultivo. Células y métodos adecuados para la expresión de los polipéptidos de la invención son aquellas que se han definido anteriormente.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un polipéptido de la invención que comprende inyectar intramuscularmente en un mejillón un agente inmunogénico y recuperar posteriormente de la hemolinfa uno o varios de los polipéptidos. En una forma preferida de realización, el agente inmunogénico que se usa está seleccionado del grupo de un cóctel de bacterias muertas, poli I:C y una mezcla de ambos.

25 En otro aspecto la invención se relaciona con un anticuerpo que reconoce específicamente al menos un polipéptido de la invención. Anticuerpos contemplados en el contexto de la presente invención incluyen antisueros policlonales, moléculas de IgG purificadas, sobrenadantes o líquido ascítico que contiene anticuerpos monoclonales, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, ScFvdiabodies, triabodies, tetrabodies anticuerpos humanizados.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los polipéptidos de la invención o su forma madura acompañado de un excipiente farmacéuticamente aceptable. Para uso en medicina, los compuestos y combinaciones de compuestos de la invención pueden ser formulados conjuntamente con un excipiente que es aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (p.ej., comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (p.ej., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). En otra realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

45 En otra realización particular, cuando el principio activo comprende un polinucleótido de la invención, la composición farmacéutica de la invención puede formularse en forma de una composición destinada para su empleo en terapia génica; a modo ilustrativo, no limitativo, en este caso, la composición farmacéutica de la invención puede contener un vector, viral o no viral, que comprende un polinucleótido de la invención o una construcción génica de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dichos vectores pueden ser vectores virales, por ejemplo, basados en retrovirus, adenovirus, etc., o no virales tales como los complejos ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. [véase "Nonviral Vectors for Gene Therapy", editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores, que contienen un polinucleótido o una construcción génica de la invención pueden ser administrados directamente al cuerpo humano o animal por métodos convencionales.

55 Alternativamente, dichos vectores pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células, por ejemplo, células de mamíferos, incluido el hombre, ex vivo, y, posteriormente implantarlas en el cuerpo humano o animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al cuerpo humano o animal dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecte adversamente a la viabilidad de dichas células.

60 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polipéptido de la invención o de un polinucleótido de la invención para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad infecciosa. Aunque los polipéptidos de la invención se han demostrado útiles para el tratamiento de infecciones bacterianas mediadas por *E. coli* y de infecciones víricas mediadas por el virus que cause la necrosis pancreática infecciosa, la presente invención contempla el uso de los polipéptidos y polinucleótidos de la invención para el tratamiento de todo tipo de enfermedades infecciosas de origen bacteriano, vírico, fúngico o parasitario. Así, la invención contempla el uso de los polipéptidos y polinucleótidos para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias tales como meningitis, carbunco, apendicitis, disenteria, bacteremia, peste, lepra, borreliosis, botulismo, bronquitis, brucelosis, peste bubónica, cerebritos, cervicitis, cólera, conjuntivitis, cistitis, dermatitis, diarrea, encefalitis, endocarditis, fiebre entérica, enteritis, enterocolitis, epididimitis, erisipela, tuberculosis, forúnculos, gangrena, gastritis, gastroenteritis, otitis, glomerulonefritis, impetigo, laringitis, tetano, mastitis, meningitis, meningoencefalitis, listeriosis, nocardiosis, oftalmatitis, osteomielitis, otitis media, pancreatitis, parotiditis, neumonía, listeremia, prostatitis, sepsis puerperal, abscesos cutáneos, pielonefri-



tis, fiebre reumática, rinitis, romboencefalitis, salmonelosis, escarlatina, sepsis, shigelosis, sífilis, peritonitis, sinusitis, traqueobronquitis, fiebres de Malta, tifus, fiebres tifoideas, ulcera y uretritis.

5 En otra forma de realización, la invención contempla el uso de los polipéptidos y polinucleótidos para el tratamiento de enfermedades causadas por hongos tales como aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, cromoblastomicosis, criptococosis, dermatomicosis, dermatofitosis, histoplasmosis, mucormicosis, micetoma, queratitis micótica, oculomicosis, otomicosis, paracoccidiomicosis, rinosporidiosis, esporotricosis, tiña, dermatitis seborreica, eccema numular, liquen simple, pitiriasis rosada de Gubert y zigomicosis.

10 En otra forma de realización, la invención contempla el uso de los polipéptidos y polinucleótidos para el tratamiento de enfermedades causadas por protozoos tales como tripanosomiasis africana, tripanosomiasis americana, amebiasis, disenteria amebiana, enfermedad de Chagas, coccidiosis, criptosporidiosis, leishmaniasis cutánea, leishmaniasis visceral, ciclosporiasis, entamebiasis, giardiasis, isosporiasis, malaria, microsporidiosis, neumocistosis, sarcosporidiosis, enfermedad del sueño, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis.

15 En otra forma de realización, la invención contempla el uso de los polipéptidos y polinucleótidos para el tratamiento de enfermedades de origen viral tales como SIDA, enfermedad respiratoria aguda, fiebre hemorrágica de Ebola, fiebre hemorrágica de Lassa, fiebre hemorrágica de Marburgo, fiebre hemorrágica argentina, fiebre hemorrágica boliviana, encefalomiелitis, gripe, gripe aviaria, fiebre aftosa, herpes genital, herpes cutáneo, herpes zoster, herpangina, varicela, 20 hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, enfermedad de Hodgkin, linfoma de Burkitt, sarcoma de Kaposi, viruela, síndrome respiratorio severo y agudo (SARS), paperas. Dengue, fiebre amarilla, encefalomiелitis, sarampión, resfriado común, conjuntivitis, gastroenteritis, cáncer cervical, linfoma, orquitis, rubéola, encefalitis de San Luis, mononucleosis, meningoencefalitis, laringitis, Molluscum contagiosum, peste porcina, infección por hantavirus, coriomeningitis linfocítica, verruga, poliomiелitis, rabia, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad 25 de Borna, difteria, encefalitis causada por Arbovirus, fiebre de Mayaro, eritema infeccioso, encefalitis LaCrosse, poliomiелitis, encefalitis del lóbulo temporal, leucoencefalitis multifocal progresiva, enfermedad respiratoria febril aguda, enfermedad de Bornholm y parotitis.

30 La invención se ilustra a continuación mediante los siguientes ejemplos que han de ser considerados como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

35 *Identificación de ADNcs que codifican péptidos antimicrobianos de mejillón mediante la técnica de sustracción de bibliotecas génicas (“Supresión subtractive hybridization technique o SSH”)*

40 Para el estudio se partió de un stock de mejillones de las Rías Bajas gallegas, a los que se estimuló mediante inyección intramuscular con un cóctel de bacterias muertas o poly I:C. A las 24 horas se les extrajo la hemolinfa, se separaron por centrifugación suero y células (hemocitos), y se extrajo RNA del pellet de hemocitos siguiendo los protocolos habituales para esta técnica. Con un pool de hemolinfa de 50 mejillones por cada tratamiento, se llevaron a cabo dos sustracciones de librerías génicas, entre animales tratados con bacteria o poly I:C y los animales control (a los que se les había inyectado agua de mar). Para ello, se sintetizó el cDNA de cada pool de hemocitos (muestras 45 de infección con bacteria, muestras de infección con poly I:C y muestras control, sin infección) mediante el kit de síntesis de cDNA de Clontech SMART PCR cDNA Síntesis kit, que permite la amplificación completa de eDNA a partir de transcritos de mRNA. Posteriormente se realizó una sustracción de librerías génicas mediante la técnica SSH llevada a cabo con el kit PCR-Select eDNA Subtraction kit (Clontech). Mediante esta técnica se identificaron genes expresados o sobre expresados en tejidos infectados, en comparación con los controles no infectados. Las secuencias 50 obtenidas expresadas diferencialmente se amplificaron mediante PCR, se ligaron en vectores de ligación con el kit TOPO TA cloning (Invitrogen) y se transformaron en bacterias *E. coli* competentes. Las colonias seleccionadas a partir de la transformación se amplificaron por PCR y se secuenciaron en secuenciador automático DNA sequencer ABI 3730. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con genes conocidos, con ayuda del BLAST. Una vez caracterizadas las secuencias, se realizaron estudios de expresión mediante PCR en tiempo real “Real Time SYBER Green PCR Assay”.

### Ejemplo 2

60 *Determinación de la actividad antimicrobiana y viricida*

Se ha determinado la actividad antimicrobiana de una combinación de miticinas y miticinas contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, birnavirus) y la bacteria *Escherichia Coli* mediante las técnicas usuales de diluciones seriadas resultando en una disminución significativa del título viral y del crecimiento bacteriano.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la identificación de un ADNc que codifica el precursor de una miticina o una mitilina que comprende
- (i) poner en contacto un mejillón un agente inmunogénico,
  - (ii) preparar librerías de ADNc de mejillones tratados con el agente inmunogénico
  - 10 (iii) efectuar una sustracción de la librería obtenida de los mejillones tratados con una preparación de ácidos nucleicos de mejillones controles y
  - (iv) aislar los ADNcs específicos de mejillones tratados con el agente inmunogénico.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el agente inmunogénico está seleccionado del grupo de un cóctel de bacterias muertas, poli I:C y una mezcla de ambos.
3. Un ADNc identificado mediante un método según las reivindicaciones 1 ó 2.
- 20 4. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico tal que definido en la reivindicación 3.
5. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 3 o una construcción génica según la reivindicación 4 que está operativamente acoplado con una secuencia que regula la expresión de dicho polinucleótido o de dicha construcción génica.
- 25 6. Una célula hospedadora que contiene una construcción génica tal que definida en la reivindicación 4 o un vector tal que definido en la reivindicación 5.
- 30 7. Un polipéptido codificado por un ADNc según la reivindicación 3.
8. Un polipéptido según la reivindicación 7 seleccionado del grupo de
- (i) un polipéptido que comprende una de las secuencias definidas en SEQ ID NO:1 a 19,
  - 35 (ii) una variante del polipéptido según (i) que muestra una identidad en la secuencia aminoacídica de al menos 90% con los polipéptidos definidos en las secuencias de 1 a 16, y
  - (iii) una variante del polipéptido según (ii) que muestra una identidad en la secuencia aminoacídica de al menos
  - 40 66% con los polipéptidos definidos en las secuencias 17 a 19.
9. Método para la obtención de un polipéptido según la reivindicación 7 u 8 que comprende transformar una célula con un vector según la reivindicación 5 y recuperar el polipéptido del interior celular o del medio de cultivo.
- 45 10. Método para la obtención de un polipéptido según la reivindicación 7 u 8 que comprende inyectar intramuscularmente en un mejillón un agente inmunogénico y recuperar posteriormente de la hemolinfa uno o varios de los polipéptidos.
11. Método según la reivindicación 10 en el que el agente inmunogénico está seleccionado del grupo de un cóctel de bacterias muertas, poli I:C y una mezcla de ambos.
- 50 12. Un anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido según las reivindicaciones 7 u 8.
13. Una composición farmacéutica que comprende al menos un polipéptido según la reivindicaciones 7 u 8 y un carrier farmacéuticamente aceptable.
- 55 14. Un polipéptido según la reivindicación 7 u 8 o una composición según la reivindicación 13 para su uso en medicina.
- 60 15. Uso de un polipéptido según la reivindicación 7 u 8 o de una composición según la reivindicación 13 para la preparación de un medicamento destinado a tratar una enfermedad infecciosa.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que la enfermedad infecciosa es una infección por *E. coli*.
- 65 17. Uso según la reivindicación 15, en el que la enfermedad infecciosa es una necrosis pancreática infecciosa.

# ES 2 334 083 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

5 <120> MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIVIRALES  
OBTENIDOS DE *MYTILUS EDULIS*

<130> P2764ES00

10 <160> 19

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 100

<212> PRT

20 <213> *Mitylus edulis*

<400> 1

25 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

30 Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Arg Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30

35 Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Leu Leu His  
40 35 40 45

45 Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Ser Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60

50 Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Asp Lys Asn Asn Glu  
65 70 75 80

55 Met Asp Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Met Glu Asn Leu Asp Gln Glu  
60 85 90 95

65 Met Asp Met Phe  
100

ES 2 334 083 A1

<210> 2

<211> 100

<212> PRT

5 <213> *Mitylus edulis*

<400> 2

10 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

15 Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 20 25 30

25 Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Leu Leu His  
35 40 45

30 Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Arg Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60

35 Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Glu Gln Asn Lys Glu  
40 65 70 75 80

45 Met Asp Asn Ser Pro Met Met Asn Glu Val Glu His Leu Asp Gln Glu  
85 90 95

50 Met Glu Met Phe  
100

55 <210> 3

<211> 100

<212> PRT

60 <213> *Mytilus edulis*

65

# ES 2 334 083 A1

<400> 3

5 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

10 Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Arg Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30

15 Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Leu Leu His  
35 40 45

20 Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Ser Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60

25 Met Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Asp Lys Asn Asn Glu  
65 70 75 80

30 Met Asp Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Val Glu Asn Leu Asp Gln Glu  
85 90 95

35 Met Glu Met Phe  
45 100

<210> 4

50 <211> 100

<212> PRT

<213> *Mytilus edulis*

55

60

65

ES 2 334 083 A1

<400> 4

5 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

10 Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30

15 Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Leu Leu His  
20 35 40 45

25 Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Ser Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60

30 Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Asp Lys Asn Asn Glu  
65 70 75 80

35 Met Asp Asn Ser Pro Lys Met Asn Glu Met Asp Asn Leu Asp Gln Glu  
40 85 90 95

45 Met Asp Met Phe  
100

<210> 5

50 <211> 100

<212> PRT

<213> *Mytilus edulis*

55 <400> 5

60 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Val Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

65

ES 2 334 083 A1

5 Val Gln Glu Ala Gln Ser Ile Pro Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30

10 Phe Cys Gly Leu Gly Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Lys Leu His  
35 40 45

15 Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Arg Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60

20

25 Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Glu Gln Asn Lys Glu  
65 70 75 80

30 Met Val Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Met Glu Asn Leu Asp Gln Glu  
85 90 95

35 Met Asp Met Phe  
100

40 <210> 6  
<211> 100  
<212> PRT  
<213> *Mytilus edulis*

45 <400> 6

50 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

55 Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Pro Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30

60

65 Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Lys Leu His  
35 40 45

# ES 2 334 083 A1

Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Arg Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60  
5

Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Glu Gln Asn Lys Glu  
10 65 70 75 80

Met Asp Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Met Glu His Leu Asp Gln Glu  
15 85 90 95

20  
Met Asp Met Phe  
100

25  
<210> 7  
<211> 100  
30 <212> PRT  
<213> *Mytilus edulis*  
35 <400> 7

Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15  
40

Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
45 20 25 30

Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Lys Leu His  
35 40 45  
50

Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Arg Arg Ala Glu Ser Pro  
55 50 55 60  
60

65



# ES 2 334 083 A1

5           Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Glu Gln Asn Lys Glu  
             65                               70                               75                               80

10           Met Val Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Met Glu Asn Leu Asp Gln Glu  
   85                               90                               95

15           Met Asp Met Phe  
   100

20           <210> 8  
             <211> 96  
             <212> PRT  
 25           <213> *Mytilus edulis*  
             <400> 8

30           Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Leu Val Ala Val Phe Val Ala  
             1                               5                               10                               15

35           Gly Ile Gly Ala His Pro Gln Val Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Gly Lys  
   20                               25                               30

40           Phe Cys Gly Thr Ala Ser Cys Thr His Tyr Gly Cys Arg Asn Leu His  
 45                                    35                               40                               45

50           Arg Gly Lys Leu Cys Phe Cys Val His Cys Ser Arg Val Lys Phe Pro  
                                   50                               55                               60

55           Phe Gly Ala Thr Gln Asp Ala Lys Ser Ile Asn Glu Leu Glu Tyr Thr  
             65                               70                               75                               80

60           Pro Ile Met Lys Ser Met Glu Asn Leu Asp Asn Gly Met Asp Met Leu  
 65                                    85                               90                               95

ES 2 334 083 A1

<210> 9  
<211> 100  
<212> PRT  
5 <213> *Mytilus edulis*  
  
<400> 9  
  
10  
Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Val Val Ile Val Gly  
1 5 10 15  
  
15  
Val Gln Glu Ala Gln Ser Ile Pro Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30  
  
25  
Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Lys Leu His  
35 40 45  
  
30  
Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Arg Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60  
  
35  
Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Glu Gln Asn Lys Glu  
40 65 70 75 80  
  
45  
Met Val Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Met Asp Asn Leu Asp Gln Glu  
85 90 95  
  
50  
Met Asp Met Phe  
100  
  
55  
<210> 10  
<211> 100  
<212> PRT  
60 <213> *Mytilus edulis*  
  
65

# ES 2 334 083 A1

<400> 10

5 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

10 Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Arg Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30

15 Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Leu Leu His  
20 35 40 45

25 Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Ser Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60

30 Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Asp Lys Asn Asn Glu  
65 70 75 80

35 Met Asp Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Met Glu His Leu Asp Gln Glu  
40 85 90 95

45 Met Asp Met Phe  
100

<210> 11

50 <211> 100

<212> PRT

<213> *Mytilus edulis*

55 <400> 11

60 Met Lys Ala Thr Ile Val Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

65

# ES 2 334 083 A1

Val Gln Glu Ala Gln Ser Ile Pro Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30  
5

Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Lys Leu His  
35 40 45  
10

Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Arg Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60  
15

Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Glu Gln Asn Lys Glu  
65 70 75 80  
20

Met Asp Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Met Asp Asn Leu Asp Gln Glu  
85 90 95  
25

Met Asn Met Phe  
100  
30

<210> 12  
<211> 100  
<212> PRT  
<213> *Mytilus edulis*  
35

<400> 12  
40

Met Lys Ala Thr Val Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15  
45

Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30  
50

Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Leu Leu His  
60  
65

# ES 2 334 083 A1

35	40	45
5	Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Arg Arg Ala Glu Ser Pro	
	50	55
10		60
	Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Lys Asn Val Asn Asp Lys Asn Asn Glu	
15	65	70
		75
		80
20	Met Asp Asn Ser Ala Val Met Asn Glu Val Glu His Leu Asp Gln Glu	
	85	90
		95
25	Met Asp Met Phe	
	100	
30		
	<210> 13	
	<211> 100	
35	<212> PRT	
	<213> <i>Mytilus edulis</i>	
	<400> 13	
40		
	Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly	
	1	5
		10
45		15
	Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys	
50	20	25
		30
55	Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Leu Leu His	
	35	40
		45
60		
	Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Ser Arg Ala Glu Ser Pro	
	50	55
		60
65		

# ES 2 334 083 A1

Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Asp Lys Asn Asn Glu  
65 70 75 80

5

Met Asp Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Ile Glu Asn Leu Asp Gln Glu  
85 90 95

10

Arg Glu Met Phe  
100

15

<210> 14

<211> 100

20 <212> PRT

<213> *Mytilus edulis*

<400> 14

25

Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

30

Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30

35

Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Leu Leu His  
35 40 45

40

Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Arg Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60

45

50

Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Asp Lys Asn Asn Glu  
65 70 75 80

55

Met Asp Asn Ser Pro Met Met Asn Glu Val Glu His Leu Asp Gln Glu  
85 90 95

60

65

Met Asn Met Phe  
100

# ES 2 334 083 A1

<210> 15

<211> 100

<212> PRT

5 <213> *Mytilus edulis*

<400> 15

10 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

15 Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30

25 Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Lys Leu His  
35 40 45

30 Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Arg Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60

35 Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Glu Gln Asn Lys Glu  
65 70 75 80

45 Met Asp Asn Ser Pro Val Met Asn Glu Met Glu His Leu Asp Gln Glu  
85 90 95

50 Met Asp Met Phe  
100

55 <210> 16

<211> 100

<212> PRT

60 <213> *Mytilus edulis*

65

# ES 2 334 083 A1

<400> 16

5 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Ile Val Gly  
1 5 10 15

10 Val Gln Glu Ala Gln Ser Val Ala Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
20 25 30

15 Phe Cys Gly Ser Ala Gly Cys Ser Leu Tyr Gly Cys Tyr Leu Leu His  
20 35 40 45

25 Pro Gly Lys Ile Cys Tyr Cys Leu His Cys Ser Arg Ala Glu Ser Pro  
50 55 60

30 Leu Ala Leu Ser Gly Ser Ala Arg Asn Val Asn Asp Arg Asn Asn Glu  
65 70 75 80

35 Met Asp Asn Ser Pro Lys Met Asn Glu Met Glu Asn Leu Asp Gln Glu  
40 85 90 95

45 Met Glu Met Phe  
100

<210> 17

50 <211> 105

<212> PRT

<213> *Mytilus edulis*

55

60

65



# ES 2 334 083 A1

<400> 17

5 Met Lys Ala Ala Ile Ile Leu Ala Ile Ala Leu Val Ala Ile Ile Ala  
1 5 10 15

10 Val His Gln Ala Lys Ser Val Val Thr Cys Gly Ser Leu Cys Lys Ala  
20 25 30

15  
20 His Cys Thr Phe Arg Lys Cys Gly Tyr Phe Met Ser Val Leu Tyr His  
35 40 45

25 Gly Arg Cys Tyr Cys Arg Cys Leu Leu Cys Ala Ser Glu His Ala Met  
50 55 60

30 Lys Phe Pro Val Asn Glu Gly Ser Ser Pro Ser Asp Met Met Pro Gln  
65 70 75 80

35  
40 Met Asn Glu Asn Glu Asn Thr Glu Phe Gly Gln Asp Met Pro Thr Gly  
85 90 95

45 Glu Thr Glu Gln Gly Glu Thr Gly Ile  
100 105

<210> 18

50 <211> 105

<212> PRT

<213> *Mytilus edulis*

55 <400> 18

60 Met Lys Ala Ala Ile Ile Leu Ala Ile Ala Leu Val Ala Ile Leu Ala  
1 5 10 15

65



# ES 2 334 083 A1

5 Gly Arg Cys Tyr Cys Lys Cys Leu Arg Cys Ser Ser Glu His Ser Met  
50 55 60

10 Lys Phe Pro Glu Asn Glu Gly Ser Ser Pro Ser Asp Met Met Pro Gln  
65 70 75 80

15 Met Asn Glu Asn Glu Asn Thr Glu Phe Gly Gln Asp Met Pro Thr Gly  
85 90 95

20

25 Glu Thr Glu Gln Gly Glu Thr Gly Ile  
100 105

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 083

② Nº de solicitud: 200703165

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.11.2007

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DATABASE UNIPROT [Online] 11 septiembre 2007 (11.09.2009) "Sequence variability of Myticins identified in haemocytes from mussels stimulated with Vibrio and poly I:C suggests ancient host-pathogen interactions." Myticin C; Precursor. Retrieved from EBI. Accesion N°: A7DWW0; A7DWX8; A7DWX1; A7DWX7; A7DWS4; A7DWX3; A7DWX5; A7DWU9; A7DWW2; A7DWX0; A7DWX6; A7DWY0; A7DWW9; A7DWX4; A7DWX2.	8
Y		1-7,9-17
X	DATABASE UNIPROT [Online] 23 octubre 2007 (23.10.2007) "Gene of the antimicrobial peptide myticin B from the Mediterranean mussel, Mytilus galloprovincialis." Myticin B; Precursor. Retrieved from EBI. Accesion N°: A7XP66.	8
Y		1-7,9-17
X	DATABASE UNIPROT [Online] 01 noviembre 1999 (01.11.1999) "Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis." Mytilin B antimicrobial peptide. Retrieved from EBI. Accesion N°: Q9Y0B1	8
Y		1-7,9-17
Y	FR 2796072 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 12.01.2001, todo el documento.	1-7,9-17

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.02.2010

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K 14/435** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,BASES DE DATOS DE SECUENCIAS EBI,MEDLINE,EMBASE,BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.02.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	1-7,9-17	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	8	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones		<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-17	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DATABASE UNIPROT [Online] 11 september 2007 (11-09-2009) "Sequence variability of Myticins identified in haemocytes from mussels stimulated with Vibrio and poly I:C suggests ancient host-pathogen interactions." Myticin C; Precursor. Retrieved from EBI. Accesion N°: A7DWW0; A7DWX8; A7DWX1; A7DWX7; A7DWS4;A7DWX3; A7DWX5; A7DWU9; A7DWW2; A7DWX0; A7DWX6; A7DWY0; A7DWW9;A7DWX4; A7DWX2	11-09-2007
D02	DATABASE UNIPROT [Online] 23 october 2007 (23.10.2007) "Gene of the antimicrobial peptide myticin B from the Mediterranean mussel, Mytilus galloprovincialis." Myticin B; Precursor. Retrieved from EBI. Accesion N°: A7XP66	23-10-2007
D03	DATABASE UNIPROT [Online] 01 november 1999 (01-11-1999) "Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels:gene structure and expression analysis." Mytilin B antimicrobial peptide. Retrieved from EBI. Accesion N°: Q9Y0B1	01-11-1999
D04	FR2796072 A1	12-01-2001

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

**1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

1.1.- En opinión de esta Oficina la reivindicación 8 carece de novedad.

El documento D01 describe secuencias de precursores de miticinas C identificadas en hemocitos de mejillones estimulados con Vibrio y poli I:C. Estas secuencias con números de acceso A7DWW0; A7DWX8; A7DWX1; A7DWX7; A7DWS4;A7DWX3; A7DWX5; A7DWU9; A7DWW2; A7DWX0; A7DWX6; A7DWY0; A7DWW9;A7DWX4; A7DWX2 , presentan un 100% de homología con las secuencias SEQ ID N°1-7,9-17 respectivamente.

El documento D02 describe la secuencia de n° de acceso A7XP66 que corresponde al péptido antimicrobiano miticina B de Mytilus galloprovincialis. Esta secuencia presenta un 90.6% de homología con SEQ ID N° 8.

El documento D03 describe la secuencia de n° de acceso Q9Y0B1 que corresponde al péptido antimicrobiano mitilina B. Esta secuencia presenta un 79% ,81,9% y 94,3% de homología con SEQ ID N° 17-19 respectivamente.

1.2.- En cuanto a la actividad inventiva el documento D04 describe la secuencia de una miticina obtenida de la hemolinfa de Mytilus galloprovincialis. La miticina obtenida tiene actividad antibacteriana y antifungicida . En este sentido, a la luz de la información técnica divulgada en los documentos D01-D03 y D04 esta Oficina considera que las reivindicaciones1-7,9-17 carecen de actividad inventiva.