



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 336 534**

② Número de solicitud: 200802267

⑤ Int. Cl.:
C07K 7/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **30.07.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **13.04.2010**

Fecha de la concesión: **01.09.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **14.09.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
14.09.2011

⑰ Titular/es: **Universidad de Zaragoza**
Campus Plaza San Francisco
Edificio Interfacultades, 1 Planta
c/ Pedro Cerbuna, 12
50009 Zaragoza, ES

⑱ Inventor/es: **Sánchez Paniagua, María Lourdes;**
Calvo Rebollar, Miguel;
Pérez Cabrejas, María Dolores;
Lavilla Martín, María y
Luis Pérez, Ruth de

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Utilización de péptidos para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.**

㉑ Resumen:

Utilización de péptidos para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.

La presente invención se encuadra dentro del sector del control de alimentos y en concreto, dentro del sector de los métodos de detección de microorganismos en alimentos basados en la utilización de ligandos específicos, concretamente se basa en el uso de péptidos que reconocen de forma específica los esporos de *Clostridium tyrobutyricum* presentes en una muestra. El uso de estos péptidos permite la detección y/o cuantificación rápida y específica de los citados esporos.

ES 2 336 534 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Utilización de péptidos para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.

5 La presente invención se encuadra dentro del sector del control de alimentos y en concreto, dentro del sector de los métodos de detección de microorganismos en alimentos basados en la utilización de ligandos específicos, concretamente se basa en el uso de péptidos que reconocen de forma específica los esporos de *Clostridium tyrobutyricum* presentes en una muestra. El uso de estos péptidos permite la detección y/o cuantificación rápida y específica de los citados esporos.

10 **Estado de la técnica anterior**

15 La fermentación butírica es un grave problema en la fabricación de quesos de pasta dura y semidura, que ocasiona pérdidas de millones de euros en el sector cada año. Dicho problema se manifiesta a lo largo de la maduración del queso y provoca un defecto conocido como la “hinchazón tardía”. En España, una parte importante de la producción quesera se ve afectada potencialmente por este problema (Rilla *et al.*, 2003. *International Journal of Food Microbiology* 85 (1): 23-33.; González *et al.*, 2007. *Food Control* 18 (6): 716-722.; Anónimo (2007a). Resolución de 11 de Julio de 2007, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. *Boletín Oficial de España* 208: 36181-36182). El principal agente responsable de la fermentación butírica es *Clostridium tyrobutyricum* (Bergère y Sivelä, 1990. *Bulletin of the International Dairy Federation* 251: 15-23), una bacteria Gram positiva, formadora de esporos, anaerobia estricta y no patógena para humanos y animales (Wiedmann *et al.*, 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson RK, Batt CA y Patel PD (Editores), Academic Press, London, pp: 451-458), que procede fundamentalmente de los ensilados. Los esporos de *Clostridium tyrobutyricum* contaminan la leche y permanecen en ella hasta que se utiliza para la elaboración del queso, dado que el tratamiento térmico de pasteurización que recibe la 25 leche, previamente, es insuficiente para inactivar los esporos (Franciosa *et al.*, 1999. *Journal of Food Protection*. 62: 867-871).

30 A lo largo de la maduración del queso se produce la germinación de los esporos, seguida de una multiplicación de las formas vegetativas, que metabolizan el lactato y liberan como productos de la fermentación, gas (H₂ y CO₂) y ácido butírico (Rosen *et al.*, 1989. *Milchwissenschaft*. 44 (6): 355-357; Herlin y Christiansson, 1993. *Milchwissenschaft*. 48 (12): 686-690). Como consecuencia, se pueden producir también defectos organolépticos en el queso como mal olor y sabor, debidos a la presencia de ácido butírico (Bergère y Favreau, 1987. *Sciences des Aliments*. 7 (nº hors-série VII): 89-98).

35 Los métodos actuales de análisis utilizados para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* son de tipo microbiológico y tardan 7 días en obtener un resultado, tiempo en el que la leche ha sido ya utilizada en la elaboración de queso. Actualmente, al no existir un método suficientemente rápido se añade a la leche destinada a la producción de quesos madurados, con carácter preventivo y de forma generalizada, la lisozima de huevo, que es un producto enzimático de elevado coste.

40 En el documento de patente US/2007/141628 se divulga un método para unir péptidos a superficies recubiertas con polietileno, comprendiendo dominios activos con un sitio de unión para agentes capaces de unirse en la superficie del polietileno. En este documento se menciona la secuencia SEQ ID NO: 1 pero no se menciona el uso reivindicado en la presente invención.

45 El documento de patente US/2007/065387 divulga el uso de agentes beneficiosos (acondicionadores y colorantes) y métodos para prolongar el tiempo de unión de estos agentes, revestidos con polímeros, a una superficie del cuerpo tal como pelo o piel, en presencia de una composición que abarca un péptido que tiene afinidad para el polímero. Se describen las secuencias de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 de la presente invención pero, al igual que en el documento anterior, no se menciona el uso reivindicado.

50 Los péptidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11 han sido citados en diversos documentos pero en ninguno de los casos se cita su uso para la detección de esporas de *Clostridium tyrobutyricum*.

55 Por otro lado, en un informe de la Doctoranda María Lavilla Martín sobre el proyecto de su Tesis doctoral: “Desarrollo de un método inmunoquímico para la detección y cuantificación de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* en leche” se hace referencia a la descripción de los objetivos y metodología a desarrollar para detectar y cuantificar esporos de *Clostridium tyrobutyricum* pero en ningún caso se incluyen las secuencias peptídicas de la presente invención.

60 La utilización de estos péptidos expresados en fagos, en métodos de detección y cuantificación de los esporos de *Clostridium tyrobutyricum*, supone una gran ventaja con respecto al método habitual de cuantificación de este microorganismo (método del número más probable) ya que se necesita 1 día frente a las incubaciones de hasta 7 días del método convencional.

Explicación de la invención

La presente invención se basa en el uso de péptidos que permiten la detección rápida y específica de los esporos de *Clostridium tyrobutyricum* presentes en una muestra. La detección de los esporos de este microorganismo se realiza en 1 día frente a los 7 días que se necesitan al emplear el método convencional (método del número más probable). El método convencional es poco específico, ya que no permite la diferenciación entre diferentes especies del género *Clostridium*. Además, los péptidos de la invención evitan de forma ventajosa la reactividad serológica no específica con otros microorganismos que se puede dar con la detección mediante métodos inmunoquímicos utilizando anticuerpos policlonales. Asimismo, se evita la laboriosidad de la obtención de anticuerpos monoclonales mediante creación de hibridomas y la falta de afinidad que estos anticuerpos suelen presentar. Otra ventaja de los péptidos con respecto a la utilización de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, es la posibilidad de la síntesis química de los mismos, que evita la necesidad de trabajar con animales de experimentación.

El término esporos hace referencia a las formas de resistencia que adoptan las bacterias, en el caso de esta invención, de la especie *Clostridium tyrobutyricum* ante condiciones ambientales desfavorables. Este término se utiliza como sinónimo de esporas.

Los péptidos son aislados mediante un procedimiento de selección por afinidad, a partir de una biblioteca de péptidos aleatorios expresados en la superficie de un bacteriófago (en adelante fago) (Phage display). Las secuencias de DNA de dichos péptidos se incluyen en el fago M13KE. De esta forma, el "Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit" contiene una librería de péptidos fusionados con una proteína de superficie del bacteriófago M13. De esta manera pueden seleccionarse aquellos péptidos que se unen de forma específica a los esporos de *Clostridium tyrobutyricum*, puede conocerse su secuencia nucleotídica y determinarse la secuencia aminoacídica resultante de las diferentes amplificaciones obtenidas.

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un péptido seleccionado de la lista que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o cualquiera de sus combinaciones.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un péptido para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*. El péptido es seleccionado; de la lista anterior, de la lista que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11, ó cualquier combinación de los péptidos de las dos listas anteriores.

El término esencialmente, en la presente invención, se refiere a las secuencias descritas anteriormente y a las siguientes secuencias derivadas de las mismas en el sentido que se describe a continuación:

- Secuencias resultantes de la eliminación de aminoácidos de las regiones N-terminal y/o C-terminal de cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13;

- Secuencias resultantes de la adición de aminoácidos a las regiones N-terminal y/o C-terminal de cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 o;

- Secuencias resultantes de la eliminación y/o adición de aminoácidos, modificados o sin modificar, en los sitios internos de la secuencia de cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13.

En el texto libre de la lista de secuencias se describen las siguientes características;

Secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13; péptido expresado en la superficie del fago M13KE.

Secuencias SEQ ID NO: 14 a SEQ ID NO: 26; secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.

En un tercer aspecto de la invención se hace referencia al uso de una secuencia nucleotídica, que constituye la secuencia codificante de cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.

Las secuencias codificantes de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 comprenderían aquellas secuencias nucleotídicas con todas las combinaciones posibles de tripletes que den lugar al mismo aminoácido ya que el código genético es degenerado y un determinado aminoácido puede estar codificado por más de un triplete. Se entiende por triplete el grupo de 3 nucleótidos que determinan un aminoácido.

En una realización preferida para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*, el péptido se selecciona de entre SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida, el péptido de la selección anterior es SEQ ID NO: 1.

ES 2 336 534 B1

Estas preferencias en las realizaciones anteriores son justificadas, tal como se menciona más adelante en el ejemplo 1, porque las secuencias de los péptidos específicos de unión a los esporos de *Clostridium tyrobutyricum* obtenidas por traducción de las secuencias nucleotídicas, presentan frecuencias de aparición diferentes. Así pues, las que mayor representación tienen en el conjunto total de secuencias amplificadas por PCR con primers específicos, se corresponden con los péptidos caracterizados por SEQ ID NO: 1 (57%), SEQ ID NO: 2 (8%), SEQ ID NO: 3 (5%) y SEQ ID NO: 4 (5%). El resto de secuencias tienen una representación de 3%. La traducción de las secuencias definidas en SEQ ID NO: 14 a SEQ ID NO: 26 corresponden una a una con las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13, es decir, la traducción de SEQ ID NO: 1 corresponde con SEQ ID NO: 14 y así sucesivamente hasta SEQ ID NO: 13, que se traduce en una secuencia definida por SEQ ID NO: 26.

Un cuarto aspecto, más concreto, de la presente invención es el uso de los péptidos descritos con anterioridad, es decir, cualquiera de los péptidos definidos por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 o cualquiera de sus combinaciones para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* en un alimento destinado a humanos o a cualquier animal.

En una realización preferida el alimento es leche o cualquier derivado lácteo.

Por una parte, en las explotaciones ligadas al pastoreo y a la producción de forrajes conservados de cultivos herbáceos se emplean dos formas de conservación de dichos forrajes: el henificado y el ensilado. Un mal manejo de los silos tanto en el proceso de realización como en la conservación, puede provocar la contaminación del mismo con microorganismos indeseables que luego, a través de la alimentación, pasarían a la leche de los ganados.

Por otra parte, tal como se menciona en el estado de la técnica, la fermentación butírica es un grave problema en la fabricación de quesos de pasta dura y semidura. El principal agente responsable de la fermentación butírica es *Clostridium tyrobutyricum*, una bacteria Gram positiva, formadora de esporos y anaerobia estricta que procede fundamentalmente de los ensilados. Los esporos de *Clostridium tyrobutyricum* contaminan la leche y permanecen en ella hasta que se utiliza para la elaboración del queso en el que se produce la germinación de los esporos, seguida de una multiplicación de las formas vegetativas, que metabolizan el lactato y liberan como productos de la fermentación, gas (H_2 y CO_2) y ácido butírico. Como consecuencia, se pueden producir también defectos organolépticos como mal olor y sabor, debidos a la presencia de ácido butírico.

Un quinto aspecto de la presente invención es la detección y/o cuantificación de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* por un método que comprende:

- a) Selección de al menos un péptido de entre SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13;
- b) inmovilización del péptido/s, marcados o no, en un soporte sólido;
- c) incubación de una muestra con los péptidos inmovilizados en (b) para la unión de los esporos a los péptidos;
- d) detección y/o cuantificación, utilizando un elemento marcado, de los esporos unidos en (c) a los péptidos inmovilizados.

Los péptidos son fijados al soporte sólido mediante diferentes procesos de unión covalente que reconozcan a los péptidos que se desean inmovilizar o al elemento que se ha incorporado a los mismos mediante el proceso de mareaje.

El mareaje consiste en la unión de un elemento que se incorpora específicamente a otro, lo que permite la localización y cuantificación de un fenómeno o proceso.

Se entiende por soporte sólido una gran variedad de materiales, como por ejemplo, la resina de intercambio iónico o adsorción, el vidrio, plástico, látex, nylon, gel, esteres de celulosa, esferas paramagnéticas o la combinación de algunos de ellos, sin excluir otro tipo de soportes no mencionados anteriormente.

En una realización preferida del método descrito anteriormente, el mareaje se realiza con un marcador seleccionado de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa.

En otra realización preferida el soporte sólido son esferas paramagnéticas. Las esferas paramagnéticas están recubiertas por grupos activos que en situaciones adecuadas reaccionan y unen covalentemente el péptido seleccionado. Además, las esferas paramagnéticas pueden estar tapizadas en superficie por estreptavidina y, en ese caso, los péptidos son conjugados con biotina para poder fijarse al soporte sólido a través de la estreptavidina.

En otra realización más preferida la detección del paso (d) del método descrito anteriormente se lleva a cabo mediante:

- a) la unión por derivatización de cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 con una molécula o enzima a modo de marcador;

ES 2 336 534 B1

- b) incubación de los péptidos obtenidos en (a) con los esporos unidos a los péptidos inmovilizados obtenidos según el método definido en el quinto aspecto de la presente invención (apartado c);
- c) incubación del producto obtenido en (b) con un complejo formado por un elemento de unión al marcador utilizado en (a) y un elemento susceptible de ser detectado y/o cuantificado;
- d) detección de los esporos mediante la reacción de la incubación del producto obtenido en (c) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

El término derivatización hace referencia a una técnica que transforma un compuesto químico a un producto de estructura química similar que cambia su reactividad, estado de agregación, etc..., resultando en un producto con nuevas propiedades químicas que puede ser usado para unirse a diferentes grupos reactivos presentes en superficies u otros compuestos químicos.

El elemento de unión al marcador del complejo definido en (c) es un compuesto que muestra afinidad química suficiente para unirse al marcador del péptido. A modo de ejemplo, si el péptido es marcado con biotina, el elemento de unión puede ser avidina.

El elemento susceptible de ser detectado y/o cuantificado debe ser un componente que sea capaz de reaccionar con algún sustrato, de forma que se derive de ello una detección cromogénica, fluorogénica y/o quimioluminiscente. Este elemento puede unirse al elemento del párrafo anterior (en el ejemplo, avidina) directamente, o a través de otro componente como puede ser biotina. Un ejemplo de elemento susceptible de ser detectado es la enzima peroxidasa. De modo que, en una realización preferida, el marcador es biotina y el complejo es avidina-biotina-peroxidasa y, además, el sustrato indicador es cromogénico, como por ejemplo, la tetrametilbencidina (TMB), el ácido azino-bis(3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico) o la fenilendiamina, sin limitación de utilizar otros sustratos.

En el caso de emplear un sustrato cromogénico, la presencia de esporos se evidencia por la aparición de un color cuya intensidad varía directamente con el número de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* presentes en la muestra y su cuantificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de espectrofotometría. Si se emplea un sustrato fluorogénico la detección y cuantificación se realiza por medio de fluorimetría y si el sustrato es quimioluminiscente, la señal se puede cuantificar por medio de un luminómetro.

Además, la detección del paso (d) anteriormente descrito puede llevarse a cabo mediante:

- a) la obtención de anticuerpos anti-esporos;
- b) conjugación de los anticuerpos obtenidos en (a) con un enzima;
- c) incubación de los anticuerpos conjugados de (b) con los complejos péptidos-esporos obtenidos según el método definido en el quinto aspecto de la presente invención (apartado c);
- d) incubación de los complejos obtenidos en (c) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

En este caso, para la obtención de anticuerpos antiesporos es necesario inyectar en un animal, como por ejemplo un conejo, esporos de *Clostridium tyrobutyricum* para inmunizarlo. Con este propósito, se realizan inyecciones subcutáneas con una suspensión de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* calentados previamente. Tres semanas más tarde, los conejos se reinyectan con una cantidad igual de esporos. Dos semanas después de la segunda inoculación, se efectúa una sangría de prueba y se comprueba la presencia de anticuerpos por el método de inmunodotting. Para las sangrías sucesivas, los animales se dejan recuperar durante 15 días, repitiéndose las inoculaciones cada 30 días aproximadamente.

Los complejos péptidos-esporos fijados en el soporte sólido (por ejemplo esferas paramagnéticas) se incuban con una solución de anticuerpos de conejo antiesporos conjugados con un enzima (por ejemplo peroxidasa) y finalmente, tras lavar para eliminar los anticuerpos no unidos, se transfieren (los nuevos complejos anclados en el soporte sólido) a una placa de 96 pocillos (u otro recipiente) y se incuban con un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

Otro aspecto de la presente invención es un kit de detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* que comprende:

- a) un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13, o cualquiera de sus combinaciones, marcado o no, e inmovilizado en un soporte sólido y
- b) medios para la detección y cuantificación de los esporos de *Clostridium tyrobutyricum* que contienen el complejo formado por un elemento de unión a los esporos marcado con un elemento susceptible de ser detectado y/o cuantificado así como un sustrato cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente para ese último elemento.

ES 2 336 534 B1

Los péptidos son inmovilizados en el soporte sólido y marcados tal como se ha definido en el aspecto anterior que trata de un método para la detección y/o cuantificación de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.

Asimismo, el soporte sólido también ha sido definido anteriormente así como los diferentes elementos de unión, marcadores, elementos de unión y modos de detección de los diferentes sustratos.

En una realización preferida del kit definido anteriormente, la inmovilización del péptido del apartado (a) se lleva a cabo de forma covalente, la detección de los esporos del apartado (b) se realiza con el péptido marcado con biotina y el complejo avidina-biotina-peroxidasa y el sustrato indicador es cromogénico.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig 1. Porcentaje de bacteriófagos eluidos durante las diferentes fases de selección de los péptidos de unión a los esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.

En el eje de las X se indica el número de la fase de selección y en el eje de las Y el porcentaje de recuperación. (Recuperación (%) = (Fagos eluidos/Fagos añadidos) x 100).

Fig 2. Detección de diferentes concentraciones de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*, con 50 (■), 20 (●) y 10 (◆) µg/mL del péptido SEQ ID NO: 1 biotinilado.

Fig 3. Porcentaje de esporos recuperados con esferas paramagnéticas tapizadas con diferentes concentraciones del péptido SEQ ID NO: 1.

En el eje de las X se indica el número teórico de moléculas de péptido por esfera y en el eje de las Y el número de esporos recuperados (Recuperación (%) = (Esporos unidos a las esferas/esporos añadidos) x 100).

Fig 4. Detección de diferentes concentraciones de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.

La detección fue llevada a cabo tras su concentración con esferas tapizadas con 100 (■), 1000 (▲), 5000 (●) y 10000 (◆) unidades del péptido SEQ ID NO: 1 por esfera, e incubando con 50 µg/mL del mismo péptido biotinilado.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos que describen el método de obtención de los péptidos así como la detección de las esporas de *Clostridium tyrobutyricum*.

Ejemplo 1

Aislamiento de los péptidos específicos frente a los esporos de Clostridium tyrobutyricum mediante la utilización de una biblioteca de expresión en fago (Phage Display)

Los fagos de la biblioteca se incubaron, para eliminar las reacciones cruzadas, con una suspensión mixta de *Clostridium acetobutylicum*, *Geobacillus stearothermophilus* y *Lactobacillus plantarum* y posteriormente, los fagos que no fueron eliminados en dicha sustracción, se incubaron con los esporos de *Clostridium tyrobutyricum* para seleccionar aquellos que le fuesen afines. Tras el proceso de unión de los fagos a los esporos, éstos se lavaron 8 veces con un tampón con Tween-20 al 0,1% con el objetivo de eliminar aquellos fagos unidos de forma no específica. Tras la amplificación de los fagos seleccionados, mediante una incubación de los mismos en un cultivo con su bacteria hospedadora, se repitió el mismo protocolo desde el principio 3 veces más (en total, 4 ciclos de sustracción y selección). En la última fase de selección el tampón de lavado se sustituyó por urea 6 M, con el fin de aumentar la fuerza del lavado y seleccionar así los fagos con mayor afinidad. (Fig 1).

Una vez que se realizó la selección de los fagos que se unen a los esporos, se sembraron placas de agar LB-IPTG/Xgal con diluciones decimales consecutivas de la suspensión de fagos procedente del último ciclo de selección. De dichas placas, y de manera individual, se transfirieron varias colonias desde dichas placas a tubos que contenían 1 mL de un cultivo de la bacteria hospedadora del fago, para amplificar su número.

Posteriormente, los fagos se concentraron añadiendo PEG/NaCl y su ADN se extrajo mediante la adición de fenol. El ADN se concentró mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 5,2, y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, dejando incubarlo a 4°C durante toda la noche. Finalmente, el ADN se lavó dos veces con etanol al 70%

ES 2 336 534 B1

previamente enfriado en hielo. Tras el último lavado, el resto de etanol que quedó en los tubos se dejó evaporar en una estufa a 40°C y el ADN se resuspendió en 50 μ L de un tampón Tris-EDTA. Para su óptima conservación, el ADN extraído se congeló a -80°C hasta su análisis.

5 Tras la extracción, se realizó una amplificación del fragmento de ADN en el que estaba codificado el péptido, mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los primers específicos. Tras la reacción se comprobó el tamaño de los insertos amplificados mediante una electroforesis en gel de agarosa. La banda que correspondió con el fragmento correcto se purificó a partir del gel mediante un sistema de columnas para centrifugación (GenElute™ Agarose Spin Columns). Posteriormente, el ADN fue secuenciado.

10

Ejemplo 2

Determinación de la secuencia de los péptidos aislados

15 A partir de la secuencia obtenida de todo el fragmento amplificado, mediante la localización de las secuencias flanqueantes, se determinó la secuencia de ADN que codificaba el péptido expresado en el fago. A continuación se presentan las secuencias obtenidas:

20 SEQ ID NO: 14 (21).

SEQ ID NO: 15 (3).

SEQ ID NO: 16 (2).

25 SEQ ID NO: 17 (2).

SEQ ID NO: 18 (1).

SEQ ID NO: 19 (1).

30

SEQ ID NO: 20 (1).

SEQ ID NO: 21 (1).

35

SEQ ID NO: 22 (1).

SEQ ID NO: 23 (1).

SEQ ID NO: 24 (1).

40

SEQ ID NO: 25 (1).

SEQ ID NO: 26 (1).

45

Los números entre paréntesis hacen referencia al número de muestras de DNA coincidentes con dicha secuencia. Estas muestras procedían de las 37 colonias de *E.coli* infectadas con los fagos aislados de la fase final del proceso de selección.

50 A partir de la secuencia nucleotídica se dedujeron las secuencias de 12 aminoácidos en cada una de ellas. Las secuencias obtenidas (ordenadas en función de su frecuencia de aparición, de mayor a menor) fueron:

SEQ ID NO: 1 (57%).

SEQ ID NO: 2 (8%).

55

SEQ ID NO: 3 (5%).

SEQ ID NO: 4 (5%).

60

SEQ ID NO: 5 (3%).

SEQ ID NO: 6 (3%).

SEQ ID NO: 7 (3%).

65

SEQ ID NO: 8 (3%).

SEQ ID NO: 9 (3%).

ES 2 336 534 B1

SEQ ID NO: 10 (3%).

SEQ ID NO: 11 (3%).

5 SEQ ID NO: 12 (3%).

SEQ ID NO: 13 (3%).

10 De todas las secuencias de péptidos obtenidas, se sintetizó aquella que se repitió con más frecuencia, es decir, SEQ ID NO: 1, en un sintetizador de péptidos de química "Fmoc" tanto sin derivatizar, como incluyendo alguna modificación amino-terminal con biotina u otra molécula o enzima a modo de marcador (fluoresceína, peroxidasa, etc...).

Ejemplo 3

15 *Determinación de la capacidad de unión del péptido sintetizado con los esporos de Clostridium tyrobutyricum*

Se realizó la incubación de varias suspensiones de diferente concentración de esporos con 10, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$ del péptido SEQ ID NO: 1 derivatizado con biotina. La unión se detectó utilizando el complejo avidina-biotina-peroxidasa y el sustrato tetrametilbencidina (TMB) de la peroxidasa (Fig 2).

Ejemplo 4

25 *Inmovilización del péptido SEQ ID NO: 1 en esferas paramagnéticas aminadas y detección de esporos de Clostridium tyrobutyricum*

En el caso de los péptidos sintetizados sin derivatizar, se inmovilizaron en esferas paramagnéticas aminadas a razón de 10^2 - 10^4 péptidos/esfera. Para estimar la capacidad de unión de los esporos a las esferas en función de la cantidad de péptido unida, las esferas se incubaron con una suspensión de 10^3 esporos y se estimó el porcentaje de recuperación mediante la enumeración en cultivo en un medio específico (Fig 3).

Las esferas paramagnéticas tapizadas con los péptidos se utilizaron para la concentración de los esporos de la muestra a analizar. Se incubó la muestra en un vial tipo Eppendorf con una concentración de esferas de al menos 10^9 esferas/mL y posteriormente, las esferas con los esporos unidos se concentraron con la ayuda de un separador magnético. Una vez lavados para eliminar microorganismos o componentes de la muestra unidos inespecíficamente, los complejos esferas-esporos se incubaron con una solución de 50 $\mu\text{g/ml}$ del péptido biotinilado (Fig 4) y finalmente, tras lavar para eliminar los péptidos no unidos, se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa y a continuación se transfirieron las esferas a una placa de 96 pocillos y se añadió un sustrato de la peroxidasa, como por ejemplo la tetrametilbencidina (TMB), el ácido azino-bis(3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico) o la fenilendiamina. En el caso de utilizar TMB como sustrato, la reacción de desarrollo del color se detiene tras 15 minutos de incubación con dicho sustrato, mediante la adición de 50 μL de ácido sulfúrico 2 M a cada pocilio. La presencia de esporos se evidenció por la aparición de un color amarillo cuya intensidad varió directamente con el número de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* presentes en la muestra de leche.

45

50

55

60

65

ES 2 336 534 B1

REIVINDICACIONES

1. Péptido seleccionado de la lista que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o cualquiera de sus combinaciones.

2. Uso de un péptido seleccionado de entre

a) un péptido según reivindicación 1,

b) un péptido seleccionado de la lista que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11, o

c) cualquier combinación de los péptidos según (a) y/o (b). para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.

3. Uso de una secuencia nucleotídica, que constituye la secuencia codificante de cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum*.

4. Uso según las reivindicaciones 2 y 3 donde el péptido se selecciona de entre SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 o cualquiera de sus combinaciones.

5. Uso según la reivindicación 4 donde el péptido es SEQ ID NO: 1.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* en un alimento.

7. Uso según la reivindicación 6 donde el alimento es leche o cualquier derivado lácteo.

8. Método de detección y/o cuantificación de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* que comprende:

a. Selección de al menos un péptido de entre SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13,

b. inmovilización del péptido/s de (a), marcado/s o no, en un soporte sólido,

c. incubación de una muestra con los péptidos inmovilizados en (b) para la unión de los esporos a los péptidos.

d. detección y/o cuantificación, utilizando un elemento marcado, de los esporos unidos en (c) a los péptidos inmovilizados.

9. Método según la reivindicación 8 donde el mareaje se realiza con un marcador seleccionado de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa.

10. Método según la reivindicación 9 donde el mareaje se realiza con biotina.

11. Método según la reivindicación 8 donde el soporte sólido son esferas paramagnéticas.

12. Método según la reivindicación 8 donde la detección del paso 8 (d) se lleva a cabo mediante:

a) la unión por derivatización de cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 con una molécula o enzima a modo de marcador.

b) incubación de los péptidos obtenidos en (a) con los esporos unidos a los péptidos inmovilizados obtenidos en 8 (c).

c) incubación del producto obtenido en (b) con un complejo formado por un elemento de unión al marcador utilizado en (a) y un elemento susceptible de ser detectado y/o cuantificado,

d) detección de los esporos mediante la reacción de la incubación del producto obtenido en (c) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

13. Método según la reivindicación 12 donde el marcador del paso (a) es biotina, el complejo del paso (c) es avidina-biotina-peroxidasa y el sustrato indicador del paso (d) es cromogénico.

ES 2 336 534 B1

14. Kit de detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* que comprende:

- a) un péptido seleccionado de entre SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13, o cualquiera de sus combinaciones, marcado o no, e inmovilizado en un soporte sólido y
- b) medios para la detección y cuantificación de los esporos de *Clostridium tyrobutyricum* que contienen los complejos definidos en 12 (c) y un sustrato cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

15. Kit según la reivindicación 15 donde la inmovilización del péptido del apartado (a) se lleva a cabo de forma covalente, la detección de los esporos del apartado (b) se realiza con el péptido marcado con biotina y el complejo avidina-biotina-peroxidasa y el sustrato indicador es cromogénico.

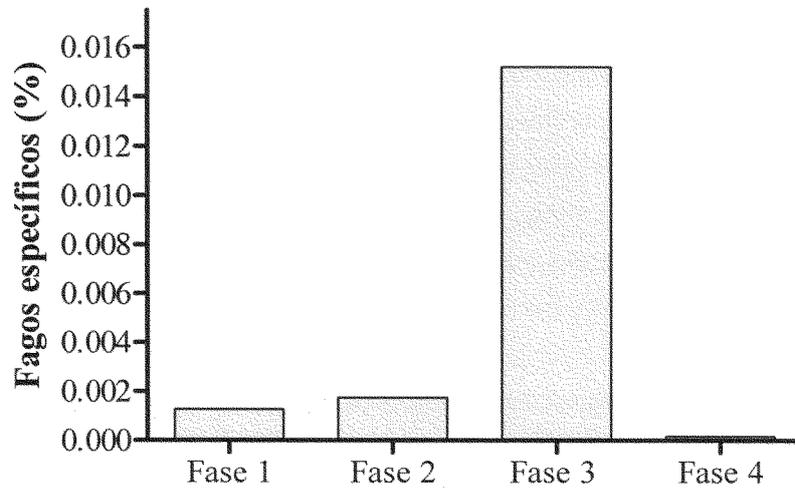


FIG. 1

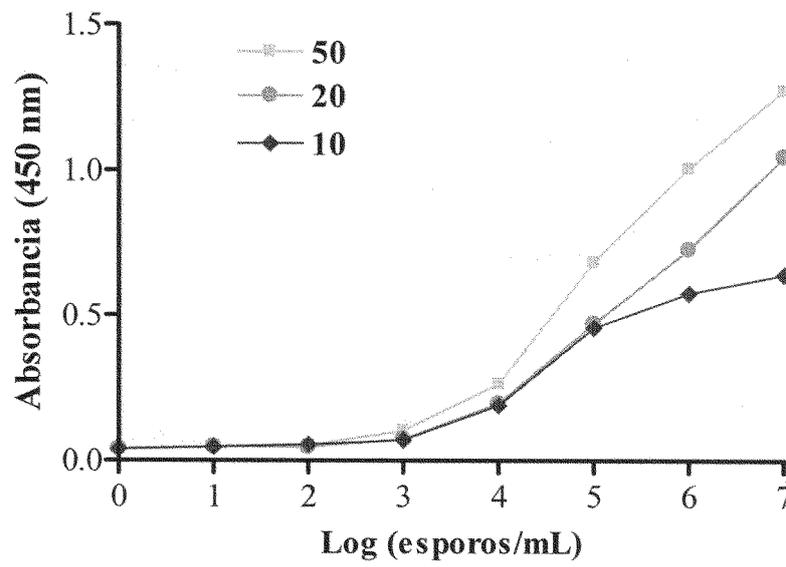


FIG. 2

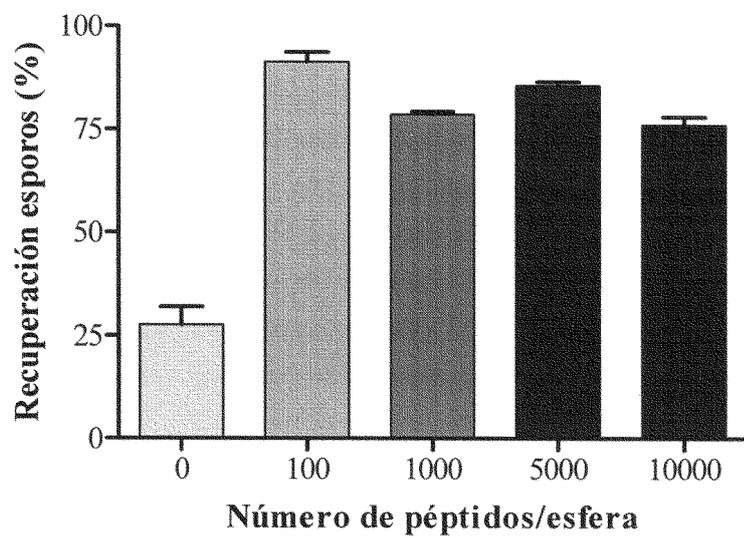


FIG. 3

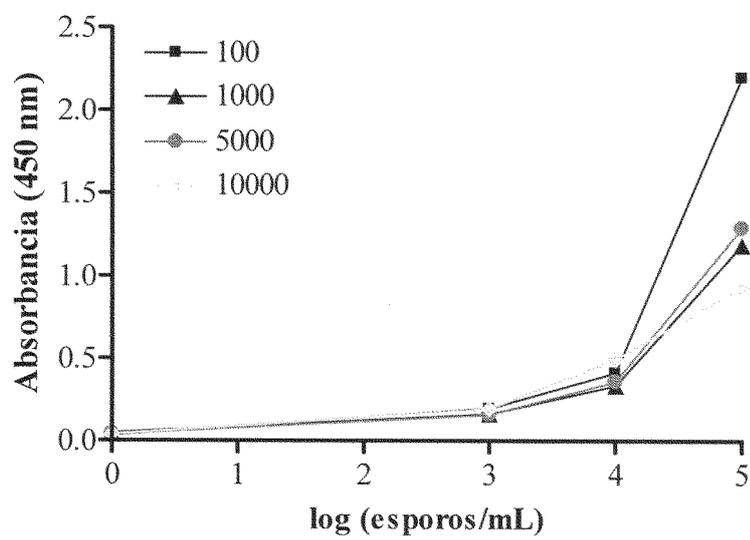


FIG. 4

ES 2 336 534 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zaragoza

5 <120> Utilización de péptidos para la detección de esporas de *Clostridium tyrobutyricum*

<130> ES1510.28

10 <160> 26

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220> mat_peptide

<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE

25 <400> 1

Leu Pro Pro Trp Lys His Lys Thr Ser Gly Val Ala
1 5 10

30 <210> 2

<211> 12

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220> mat_peptide

<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE

40 <400> 2

Ala Thr Trp Ser His His Leu Ser Ser Ala Gly Leu
1 5 10

45 <210> 3

<211> 12

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220> mat_peptide

<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE

55 <400> 3

Ala Met Ser Pro Arg His His Ser Gly Pro Ser Val
1 5 10

60 <210> 4

<211> 12

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220> mat_peptide

ES 2 336 534 B1

<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE

<400> 4

5 Thr Met Gly Phe Thr Ala Pro Arg Phe Pro His Tyr
 1 5 10

<210> 5

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220> mat_peptide

<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE

<400> 5

20 Ser Ile Leu Ser Thr Met Ser Pro His Gly Ala Thr
 1 5 10

<210> 6

25 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220> mat_peptide

<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE

<400> 6

35 Val Ser Arg His Gln Ser Trp His Pro His Asp Leu
 1 5 10

<210> 7

40 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220> mat_peptide

<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE

<400> 7

50 Ser Ala His Gly Thr Ser Thr Gly Val Pro Trp Pro
 1 5 10

<210> 8

55 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220> mat_peptide

<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE

<400> 8

65 Thr Ala Gly Lys Leu Thr Ala Ser Leu Ile Gly Arg
 1 5 10

ES 2 336 534 B1

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220> mat_peptide
<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE
10
<400> 9
Asn Phe Met Glu Ser Leu Pro Arg Leu Gly Met His
1 5 10

15 <210> 10
<211> 12
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220> mat_peptide
<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE
25
<400> 10
Trp Ala Pro Pro Leu Phe Arg Ser Ser Leu Phe Tyr
1 5 10

30 <210> 11
<211> 12
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220> mat_peptide
<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE
40
<400> 11
Thr Cys Ser Leu Cys Asn Pro Val Gln Pro Gln Arg
1 5 10

45 <210> 12
<211> 12
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220> mat_peptide
<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE
55
<400> 12
His Tyr Ser Ala His Trp Asn Leu Ser Thr Thr Pro
1 5 10

60 <210> 13
<211> 12
<212> PRT
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 336 534 B1

<220> mat_peptide

<223> péptido expresado en la superficie del fago M13KE

5 <400> 13

Leu Leu Ala Asp Thr Thr His His Arg Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 14

10 <211> 36

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15 <220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostrydium tyrobutyricum*

20 <400> 14

ttgcctcctt ggaagcataa gacgtcgggt gttgct
36

<210> 15

25 <211> 36

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

30 <220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostrydium tyrobutyricum*

35 <400> 15

gcgacgtggt ctcacatct gagttctgcg ggtttg
36

<210> 16

40 <211> 36

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

45 <220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostrydium tyrobutyricum*

50 <400> 16

gctatgagtc ctcgtcatca ttctggctct tcggtt
36

<210> 17

55 <211> 36

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

60 <220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostrydium tyrobutyricum*

65

ES 2 336 534 B1

<400> 17

actatggggtt ttacggctcc gcggtttccg cattat
36

5

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostrydium tyrobutyricum*

15

<400> 18

tctatdddgt ctactatgtc gccgcatggt gctacg
36

20

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

25 <213> Secuencia artificial

<220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostrydium tyrobutyricum*

30

<400> 19

gtdtcgctc atcagtcgtg gcatccgcat gatcctt
36

35

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

40 <213> Secuencia artificial

<220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostrydium tyrobutyricum*

45

<400> 20

tctgcatg ggacgtctac tgggtttccg tggccg
36

50

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

55 <213> Secuencia artificial

<220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostrydium tyrobutyricum*

60

<400> 21

actgctggta aggtgacggc ttcgttgatt ggtcgt
36

65

<210> 22

<211> 36

ES 2 336 534 B1

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5 <220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostridium tyrobutyricum*

<400> 22

10 **aattttatgg agtctcttcc tcggctgggt atgcat**
 36

<210> 23

<211> 36

15

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20 <220> misc_feature

<223> secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostridium tyrobutyricum*

<400> 23

25 **acgtgtagtt tgtgtaatcc tgtgcagcct cagcgg**
 36

<210> 24

<211> 36

30

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

35 <220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostridium tyrobutyricum*

<400> 24

40 **tgggctcctc cgctgtttcg ttcttctttg ttttat**
 36

<210> 25

<211> 36

45

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

50 <220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostridium tyrobutyricum*

<400> 25

55 **cattattctg ctcattgga tttgtctacg acgccg**
 36

<210> 26

<211> 36

60

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

65 <220> misc_feature

<223> Secuencia de interés biológico codificante de péptidos que reconocen esporos de *Clostridium tyrobutyricum*

ES 2 336 534 B1

<400> 26

ctgcttgagg atacgacgca tcataggccg tggact
36

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 336 534

② Nº de solicitud: 200802267

③ Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C07K 7/08** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	WO 03037172 A2 (GPC BIOTECH INC) 08.05.2003, figura 1, seq. 225.	1 2-15
X A	US 20040102382 A (SCHUGHART K) 27.05.2004, página 5, seq. 26.	1 2-15
X A	DE 102005031755 A1 (TECHNISCHEN UNIVERSITAT DRESDEN) 11.01.2007, página 4, seq. 17,30.	1 2-15
A	US 20070141628 A1 (CUNNINGHAM SCOTT D) 21.06.2007, Tabla 7, seq. 2.	2-15
A	US 20070065387 A1 (WILLIAN A. BECK) 22.03.2007, Tabla 5, seq. 20; tabla 6, seq. 29; tabla 8, seq. 38.	2-15
A	MARIA LAVILLA MARTIN, Desarrollo de un método Inmunoquímico para la detección y cuantificación de esporos de Clostridium tyrobutyricum en leche" Departamento. P.A.C.A- Tecnología de los Alimento- Universidad de Zaragoza, 31.03.2008 Recuperado de Internet http://www.catedu.es/ctamagazine/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=300	2-15

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
26.03.2010

Examinador
A. Santos Díaz

Página
1/5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 336 534

② Nº de solicitud: 200802267

③ Fecha de presentación de la solicitud: **30.07.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C07K 7/08** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	<p>Maria Lavilla, et al. Production of polyclonal antibodies against spores of Clostridium tyrobutyricum, a contaminant affecting the quality of cheese: characterization of the immunodominant protein. Marzo 2008 Food and Agricultural Immunology, vol 19, No1, pag. 77-91</p> <p>pag. 88-89</p>	2-15

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

26.03.2010

Examinador

A. Santos Díaz

Página

2/5

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

C07K, G01N

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

INVENES, EPODOC, DWPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-15	SÍ
	Reivindicaciones	1	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-15	SÍ
	Reivindicaciones	1	NO

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	WO 03037172 A2	08-05-2003
D02	US 20040102382 A	27-05-2004
D03	DE 102005031755 A1	11-01-2007

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 (Art. 6.1 LP)****1.1 Reivindicación 1:**

Los péptidos reivindicados en la reivindicación 1 salvo el correspondiente a la SEQ ID: NO 12, han sido divulgados idénticamente en los siguientes documentos:

D01 la secuencia 225 es idéntica a la SEQ ID: NO 3

D02 la secuencia 26 es idéntica a la SEQ ID: NO 10

D03 la secuencia 17 es idéntica a la SEQ ID: NO 13 y la secuencia 30 solo difiere de SEQ ID : NO 8 en que la Leucina de la posición 5 ha sido substituida por una Valina.

Por lo tanto la reivindicación 1 no cumple el requisito de novedad.

1.2 Reivindicaciones 2-15:

Las reivindicaciones 2-15 cumplen el requisito de novedad

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP)

2.1 En vista del argumento desarrollado en el punto 1, la reivindicación 1 no presenta actividad inventiva.

2.2 Reivindicaciones independientes 2, 3, 8, 14 .

Ninguno de los documentos citados describe el uso de los péptidos SEQ ID:1-3, ni de las secuencias nucleotídicas codificantes de los mismos para la detección de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* según las reivindicaciones 2 y 3.

Tampoco se describen los métodos de detección y cuantificación, ni el KIT correspondiente según las reivindicaciones 8 y 14.

Por lo tanto las reivindicaciones 2, 3, 8 y 14 y las reivindicaciones dependientes de las mismas cumplen el requisito de actividad inventiva.