

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 466**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 14/335** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06849028 .3**  
96 Fecha de presentación: **08.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1968623**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **Péptidos inductores de bacteriocinas**

30 Prioridad:  
**08.12.2005 US 297841**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.06.2012**

73 Titular/es:  
**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS  
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF  
AGRICULTURE  
1400 INDEPENDENCE AVENUE S.W.  
WASHINGTON, DC 20250-0302, US y  
State Research Center for Applied Microbiology  
and Biotechnology**

72 Inventor/es:  
**STERN, Norman, J.;  
SVETICH, Edward, A.;  
ERUSLANOV, Boris, V.;  
PERELGIN, Vladimir, V. y  
LEVCHUK, Vladimir, P.**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 382 466 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Péptidos inductores de bacteriocinas.

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 **[0001]** Esta invención se refiere a nuevos péptidos que estimulan la producción de bacteriocinas por las bacterias productoras en presencia de bacterias inductoras y a procedimientos para el uso de los péptidos para la producción de bacteriocinas.

Descripción de la técnica relacionada

15 **[0002]** Las bacterias intestinales normales son críticas para la salud de cualquier animal hospedador. El hospedador se beneficia a través de los procesos metabólicos digestivos mediados por la biota bacteriana nativa. Desde la perspectiva de las bacterias intestinales, la competencia y la consiguiente evolución proporcionan nutrientes y espacio vital y aumentan el potencial reproductivo, lo que permite que ciertas cepas y especies obtengan ventajas de supervivencia. Durante la evolución bacteriana ha tenido lugar la producción de las bacteriocinas. Las bacteriocinas son antagonistas para otros organismos dentro de un nicho competitivo dado y, por lo tanto, proporcionan una ventaja ecológica. Típicamente, estas bacteriocinas son polipéptidos de bajo peso molecular y se clasifican sobre la base de diferencias en el peso molecular (Klaenhammer, FEMS Microbiol. Rev., volumen 12, 39-85, 1993). Estos compuestos pueden digerirse fácilmente para dar sus aminoácidos componentes mediante enzimas proteasas del hospedador. Las bacteriocinas pueden representar un componente significativo de los beneficios derivados de la exclusión competitiva (Nurmi y Rantala, Nature, London, volumen 241, 210-211, 1973).

30 **[0003]** Nurmi y Rantala (1973, cita anterior) describieron originalmente las ventajas de la exclusión competitiva en el control de la colonización por *Salmonella* entre pollos recién eclosionados mediante el uso de una flora bacteriana indefinida derivada de las heces de aves adultas sanas. Esta estrategia es una alternativa atractiva a las prácticas actuales en la cría de animales que implican el uso de antibióticos sintéticos. Se ha descrito una flora de exclusión competitiva derivada de mucosas (Stern y col., patente de los EE. UU. 5.451.400, concedida en septiembre de 1995) como un cultivo anaerobio derivado de raspaduras del revestimiento mucoso intestinal en gallinas adultas sanas. Esta flora indefinida proporcionó una excelente protección contra la colonización por *Salmonella* en pollos, pero solo proporcionó un control inconsistente de la colonización por *Campylobacter* (Stern, Poult. Sci. volumen 73, 402 – 407, 1994). La exclusión competitiva tiene lugar dentro del tracto intestinal de las aves salvajes y contribuye a una sana ecología intestinal.

40 **[0004]** Los microorganismos producen una diversidad de compuestos que demuestran propiedades antibacterianas. Un grupo de estos compuestos, las bacteriocinas, constan de proteínas bactericidas con un mecanismo de acción similar al de los antibióticos ionóforos. Las bacteriocinas son frecuentemente activas contra especies que están estrechamente relacionadas con el productor de la bacteriocina. Su presencia generalizada en especies bacterianas aisladas de comunidades microbianas complejas, como el tracto intestinal, las superficies orales u otras superficies epiteliales, sugiere que las bacteriocinas pueden tener un papel regulador con respecto a la dinámica poblacional dentro de los ecosistemas bacterianos. Las bacteriocinas se definen como compuestos producidos por bacterias que tienen una fracción de proteína biológicamente activa y actividad bactericida (Tagg y col., Bacteriological Reviews, volumen 40, 722 – 256, 1976). Otras características pueden incluir: (1) un limitado espectro de actividad inhibitoria centrado en especies estrechamente relacionadas; (2) la unión a receptores celulares específicos; (3) determinantes genéticos contenidos en plásmidos para la producción de bacteriocinas y para inmunidad de la célula hospedadora a las bacteriocinas. Otras sustancias antagonistas definidas de forma incompleta se han denominado “sustancias similares a bacteriocinas”. Algunas bacteriocinas eficaces contra bacterias grampositivas, a diferencia de las bacterias gramnegativas, tienen un espectro de actividad más amplio. Se ha sugerido que el término bacteriocina, cuando se usa para describir agentes inhibitorios producidos por bacterias grampositivas, debería satisfacer unos criterios mínimos (1) ser un péptido y (2) tener actividad bactericida (Tagg y col., cita anterior).

50 **[0005]** Con el fin de hacer económicamente factible el uso comercial de las bacteriocinas, es necesaria la optimización del rendimiento durante la producción (Chen y Hoover, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, volumen 2, 82 – 100, 2003). Chen y Hoover afirman que, para la producción de nisina, se encontró que los factores decisivos en el medio de crecimiento eran el mantenimiento de un pH óptimo y el enriquecimiento del medio con nutrientes específicos para cada cepa o cepas productoras de la bacteriocina.

60 **[0006]** Knutsen y col. (Journal of Bacteriology, volumen 186 (10), 3078 – 3085, 2004) desvelan un péptido inductor de bacteriocinas (BIP) de 27 aminoácidos que induce la producción de bacteriocinas en *Streptococcus*

*pneumoniae*. Diep y col. (Molecular Biology, volumen 47 (2), 483 – 494, 2003) desvelan que se ha encontrado que una serie de bacterias grampositivas aplican una, así denominada, ruta de transducción de señales a base de feromonas peptídicas para regular la producción de péptidos antimicrobianos, conocidos como bacteriocinas, de numerosas bacterias del ácido láctico. También desvelan una feromona peptídica, PlnA, que induce la producción de bacteriocinas. Van Belkum y Stiles (Nat. Prod. Rep., volumen 17, 323 – 335, 2000) desvelan que algunas bacteriocinas requieren los productos de genes reguladores para su producción. Estos autores afirman que estos genes codifican un péptido inductor secretado y proteínas que son homólogas a histidina-cinasas y a reguladores de respuesta. La referencia desvela además que algunas bacteriocinas de la clase II son inducidas por un péptido inductor mientras que otras, como camobacteriocina B2 y sakacina P, son inducidas por un péptido inductor o se autoinducen por la bacteriocina sintetizada.

**[0007]** Mientras que se han encontrado diversos péptidos que inducen la producción de bacteriocinas en bacterias, en la técnica sigue existiendo la necesidad de una producción comercial de bacteriocinas mediante el uso de péptidos que aumenten el rendimiento de la producción de bacteriocinas *in vitro*. La presente invención proporciona péptidos que son diferentes de los péptidos de la técnica anterior y proporciona un procedimiento para la producción de grandes cantidades de bacteriocinas para uso comercial.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

**[0008]** Un objetivo de la presente invención es proporcionar péptidos que estimulan la producción de bacteriocinas *in vitro* y tienen la secuencia carboxiterminal VKGLT (SEQ ID NO 1).

**[0009]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un péptido con la secuencia de aminoácidos: MVTKSLVLAWVVALLACGMVKGLT (SEQ ID NO 3).

**[0010]** Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un péptido con la secuencia de aminoácidos: TNVTKSWWVLAGCNQVVASNCNGNVKGLT (SEQ ID NO 5).

**[0011]** Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar un péptido con la secuencia de aminoácidos: WNKYKTNWVLSVCNTGCACAAVKGLT (SEQ ID NO 7).

**[0012]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para aumentar la producción de bacteriocinas *in vitro*, en el que se añade un péptido con la secuencia carboxiterminal VKGLT (SEQ ID NO 1) a un cultivo de células productoras de bacteriocinas.

**[0013]** Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para aumentar la producción de la bacteriocina OR-7 *in vitro*, en el que se añade un péptido con la secuencia de SEQ ID NO 3 a un cultivo de células de *Lactobacillus salivarius* PDV-32 (NRRL B-30514).

**[0014]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para aumentar la producción de la bacteriocina 50-52 *in vitro*, en el que se añade un péptido con la secuencia de SEQ ID NO 5 a un cultivo de células de *Enterococcus faecium* LWP-50-52 (NRRL B-30746).

**[0015]** Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para aumentar la producción de la bacteriocina 760 *in vitro*, en el que se añade un péptido con la secuencia de SEQ ID NO 7 a un cultivo de células de *Streptococcus cricetus* LWP-760 (NRRL B-30745).

#### DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

**[0016]** *Lactobacillus salivarius*, denominado NRRL B-30514 (cepa PVD-32), se depositó el 3 de agosto de 2001. *Streptococcus cricetus*, denominado NRRL B-30745 (cepa LWP-760), y *Enterococcus faecium*, denominado NRRL B-30746 (cepa LWP-50-52), se depositaron el 3 de mayo de 2004; y *Lactobacillus acidophilus*, denominado NRRL B-30510 (cepa LWP-320), se depositó el 3 de agosto de 2001. *Lactobacillus crispatus*, denominado NRRL B-30884 (cepa LWP-252), se depositó el 4 de noviembre de 2005. Todas las cepas anteriores se han depositado de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest en la Colección de Cultivos de Patentes del Servicio de Investigación Agrícola del U.S.D.A. (National Center for Agricultural Utilization Research, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604, EE. UU.).

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

**[0017]** Las figuras 1A y 1B son fotografías que muestran la detección directa del péptido señal y la bacteriocina OR-7 después de SDS-PAGE (A) e isoelectroenfoque (B). El gel se cubrió con *Campilobacter jejuni* para determinar qué banda(s) correspondía(n) a la actividad antimicrobiana, su peso molecular y punto isoeléctrico. En la figura 1A, el carril 1 contiene marcadores de masa molecular en el intervalo de bajo peso molecular (LWM)

2.100-12.500 (Amersham Pharmacia Biotech): 2.100, 5.780, 8.400, 12.500 Da. La banda en el carril 2 que contenía la bacteriocina OR-7 pura corresponde a la actividad antimicrobiana, la masa de la zona de inhibición del crecimiento fue de aproximadamente 5,5 kDa. La masa de la banda en el carril 3 que contenía el péptido señal de PVD-32 puro fue de aproximadamente 2,5 kDa. En la figura 1B, el carril 1 contiene la bacteriocina OR-7 pura, que corresponde a la actividad antimicrobiana; el pl de la zona de inhibición del crecimiento fue de aproximadamente 8,4. El pl de la banda en el carril 2 que contenía el péptido señal de PVD-32 puro fue de aproximadamente 7,9. El carril 3 contenía estándares de pl (Protein Test Mixture, I Marker Proteins, Serva): 10,0, 9,2, 8,1, 6,9, 5,5, 4,3.

**[0018]** Las figuras 2A y 2B son fotografías que muestran la detección directa del péptido señal y la bacteriocina 50-52 después de SDS-PAGE (A) e isoelectroenfoque (B). Los geles se cubrieron con *Campilobacter jejuni* para determinar qué banda(s) correspondía(n) a la actividad antimicrobiana, su peso molecular y punto isoelectrico. En la figura 1A, el carril 1 muestra marcadores de masa molecular en el intervalo LWM de aproximadamente 2.100-12.500 (Amersham Pharmacia Biotech): 2.100, 5.780, 8.400, 12.500 Da. La banda en el carril 2 que contenía la bacteriocina 50-52 pura corresponde a la actividad antimicrobiana, la masa de la zona de inhibición del crecimiento fue de aproximadamente 3,9 kDa. La masa de la banda en el carril 3 que contenía el péptido señal de LWP-50-52 puro fue de aproximadamente 3,1 kDa. En la figura 2B, la banda en el carril 1 que contenía la bacteriocina 50-52 pura corresponde a la actividad antimicrobiana; el pl de la zona de inhibición del crecimiento fue de aproximadamente 8,4. El pl de la banda en el carril 2 que contenía el péptido señal de LWP-50-52 puro fue de aproximadamente 8,1. El carril 3 contenía estándares de pl (Protein Test Mixture, I Marker Proteins, Serva): 10,0, 8,1, 7,9, 6,4, 5,5, 4,3, 4,1 y 3,8.

**[0019]** Las figuras 3A y 3B son fotografías que muestran la detección directa del péptido señal y la bacteriocina 760 después de SDS-PAGE (A) e isoelectroenfoque (B). Los geles se cubrieron con *Campilobacter jejuni* para determinar qué banda(s) correspondía(n) a la actividad antimicrobiana, su peso molecular y punto isoelectrico. En la figura 3A, el carril 3 muestra marcadores de masa molecular en el intervalo LWM de aproximadamente 2.100-12.500 (Amersham Pharmacia Biotech): 2.100, 5.780, 8.400, 12.500 Da. La banda en el carril 1 que contenía la bacteriocina 760 pura corresponde a la actividad antimicrobiana, la masa de la zona de inhibición del crecimiento fue de aproximadamente 5,5 kDa. La masa de la banda en el carril 3 que contenía el péptido señal de LWP-760 puro fue de aproximadamente 2,1 kDa. En la figura 3B, la banda en el carril 1 que contenía la bacteriocina 760 pura corresponde a la actividad antimicrobiana; el pl de la zona de inhibición del crecimiento fue de aproximadamente 9,5. El pl de la banda en el carril 2 que contenía el péptido señal de LWP-760 puro fue de aproximadamente 8,9. El carril 3 contenía estándares de pl (Protein Test Mixture, I Marker Proteins, Serva): 10,0, 8,1, 7,9, 6,4, 5,5, 4,3, 4,1 y 3,8.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

**[0020]** Cada vez se reconoce más la importancia de las infecciones entéricas en humanos y la relación entre la contaminación de las aves de corral y la infección humana está bien documentada. También es bien conocida la capacidad de disminuir este riesgo para la salud mediante la toma de medidas en las plantas de procesamiento de aves de corral. Durante la producción y el procesamiento de pollos de engorde, los materiales fecales que contienen patógenos se transfieren a la carne y persisten en las cocinas de procesamiento de alimentos.

**[0021]** Algunos metabolitos de organismos competidores pueden contribuir al control de patógenos como *Campylobacter jejuni* y *Salmonella*. *Lactobacillus salivarius*, denominado NRRL B-30514 (cepa PVD-32), *Streptococcus cricetus*, denominado NRRL B-30745 (cepa LWP-760) y *Enterococcus faecium*, denominado NRRL B-30746 (cepa LWP-50-52) producen nuevas bacteriocinas que son el sujeto de la solicitud pendiente de patente de los Estados Unidos 10/644.927, presentada el 21 de agosto de 2003, US 2005 153881, y la solicitud pendiente de patente de los Estados Unidos 10/426.688, presentada el 1 de mayo de 2003, US 2004 220093. Estas cepas también producen péptidos que estimulan a las cepas para producir mayores cantidades de bacteriocinas *in vitro*.

**[0022]** En este documento se describen péptidos señal y las cepas que producen estos péptidos, cepas inductoras, secuencias de aminoácidos y procedimientos para el uso de los péptidos y las cepas inductoras.

**[0023]** *Lactobacillus salivarius* PVD-32 (NRRL B-30514) produce el péptido señal SEQ ID NO 3. Es un aerobio con bacilos grampositivos, capaz de crecer a aproximadamente 37 °C. La cepa crece en agar nutritivo o de recuento en placa produciendo bordes de forma irregular. Las colonias son de color blanco y de aproximadamente 3 mm de diámetro después del cultivo aerófilo durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 37 °C.

**[0024]** *Enterococcus faecium* LWP-50-52 (NRRL B-30746) produce el péptido señal SEQ ID NO 5. Es un aerobio facultativo con cocos grampositivos y es capaz de crecer a aproximadamente 37 °C. La cepa crece en agar nutritivo o de recuento en placa produciendo bordes de forma irregular. Las colonias son de color gris y de aproximadamente 2 mm de diámetro después del cultivo microaerófilo a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 24 horas.

**[0025]** *Streptococcus cricetus* LWP-760 (NRRL B-30745) produce el péptido señal SEQ ID NO 7. Es un aerobio facultativo con cocos grampositivos y es capaz de crecer a aproximadamente 37 °C. La cepa crece en agar nutritivo o de recuento en placa produciendo bordes de forma regular. Las colonias son de color gris y de aproximadamente 1 mm de diámetro después del cultivo microaerófilo durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 37 °C.

**[0026]** *Lactobacillus acidophilus* LWP-320 (NRRL B-30510) es una cepa inductora que es un aerobio facultativo con cocos grampositivos y capaz de crecer a aproximadamente 37 °C. La cepa crece en agar nutritivo o de recuento en placa produciendo bordes de forma irregular. Las colonias son de color blanco y de aproximadamente 3 mm de diámetro después del cultivo microaerófilo durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 37 °C.

**[0027]** *Lactobacillus crispatus* LWP- 252 (NRRL B-30884) es una cepa inductora que es un aerobio facultativo con cocos grampositivos y capaz de crecer a aproximadamente 37 °C. La cepa crece en agar nutritivo o de recuento en placa produciendo bordes de forma regular. Las colonias son de color gris y de aproximadamente 1 mm de diámetro después del cultivo aerófilo durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 37 °C.

**[0028]** Los péptidos señal de cepas productoras bacteriocinas se aislaron y purificaron. Las células de las cepas productoras secretan fundamentalmente bacteriocinas de la clase II a través del sistema de transporte ABC (Haverstein y col., Mol. Microbiol., volumen 16, 229 – 240, 1995; Gajic y col., J. Biol. Chem., volumen 36, 34291 – 34298, 2003). La secreción de algunas bacteriocinas de esta clase tiene lugar debido a péptidos señal que se activan por la translocasa Sec localizada en las membranas citoplasmáticas (Cintas y col., Appl. Environ. Microbiol., volumen 63, 4321 – 4330, 1997; Doi y col., J. Biosci. Bioeng., volumen 93, 434 – 436, 2002; Leer y col., Microbiology, volumen 141, 1629 – 1635, 1995; Martinez y col., Microbiology, volumen 145, 3155 – 3161, 1999; Tomita y col., J. Bacteriol., volumen 178, 3585 – 3593, 1999; Worobo y col., J. Bacteriol., volumen 177, 3143 – 3149, 1995; Herranz y col., J. Appl. Environ. Microbiol., volumen 71 (4), 1959 – 1963, 2005). Otra función de los péptidos señal probablemente está asociada con el fenómeno bacteriano de la “detección de quórum” (De Kievit y col., Infection and Immunity, volumen 68(9), 4839 – 4849, 2000; Dunny y col., en: Microbial Signaling and Communication, England y col. (eds.), University Press, Cambridge, Reino Unido, 117 – 138, 1999; Dunning y Leonard, Annu. Rev. Microbiol., volumen 51, 527 – 564, 1997; Kleerebezem y col., Mol. Microbiol., volumen 24, 895 – 904, 1997). Un péptido señal, solo o en un complejo con metabolitos de una cepa inductora, activa la histidina-proteína-cinasa en la cepa productora, con lo que aumenta la producción de bacteriocinas. Para obtener una producción de péptido máxima, las células que producen los péptidos señal, como PVD-32, LWP-50-52 y LWP-760, se cultivaron durante aproximadamente 2 – 10 horas en caldo M9 enriquecido con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de fenilalanina, triptófano, alanina y mezclas de estos. Una realización preferida de la presente invención incluye cantidades de aminoácidos en el intervalo de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,1 % para cada aminoácido incluido en la composición. Un medio de caldo de *Brucella* aproximadamente al 10 % resulta en la producción de un péptido señal a una concentración inferior.

**[0029]** El péptido señal se aísla del sobrenadante del cultivo por precipitación con sulfato amónico, seguida de (1) filtración en gel mediante cromatografía de alta resolución con Superose 12 y (2) cromatografía de interacción hidrófoba con octil-Sepharose 6B de flujo rápido.

**[0030]** Los péptidos señal descritos en este documento se usan para aumentar la producción de bacteriocinas *in vitro* por las células productoras, en presencia de una bacteria inductora. El péptido señal puede añadirse en cualquier momento durante el cultivo de las bacterias inductora y productora. Teniendo en cuenta la Descripción Detallada anterior, un experto en la técnica podría determinar fácilmente el momento de adición del péptido señal para lograr altos niveles de producción de bacteriocinas en comparación con la producción de bacteriocinas en cultivos que solamente contienen el péptido y la bacteria productora o solamente las bacterias productora e inductora.

**[0031]** La actividad antagonista de las bacteriocinas producidas al usar el péptido señal y una cepa de bacterias inductora contra *C. jejuni* y *S. enteritidis* se evaluó mediante un ensayo de zonas de inhibición. Las etapas incluyeron la toma de diversas concentraciones de la preparación pura (µg/ml) de la bacteriocina en aproximadamente 10 µl de volumen extendidos sobre placas de agar de *Campylobacter* o agar nutritivo (MPA o agar de extracto de carne y peptona) enriquecido con sangre, previamente sembradas con células de la bacteria diana. Las placas que contenían cultivos de *C. jejuni* se incubaron a aproximadamente 42 °C en condiciones microaerobias. Las placas que contenían *S. enteritidis* se incubaron a aproximadamente 37 °C en condiciones aerobias. La actividad de la bacteriocina se expresó en unidades arbitrarias (UA) por un mililitro de la preparación para la que aparece una zona visible de inhibición del crecimiento del cultivo (Henderson y col., Archives of Biochemistry and Biophysics, volumen 295, 5 – 12, 1992). La actividad específica también puede expresarse como unidades arbitrarias por miligramo de bacteriocina pura.

**[0032]** Los péptidos señal pueden incluir cualquier péptido con una secuencia carboxiterminal VKGLT (SEQ ID

NO 1) producido por una bacteria secretora de bacteriocinas que aumente la producción de bacteriocinas al añadirlo a un cultivo que incluye una bacteria productora o una bacteria productora y una bacteria inductora.

**[0033]** Para los fines de la presente invención, una bacteria inductora se define como cualquier bacteria que, al cultivarla con una bacteria que produce bacteriocinas – una bacteria productora – junto con el péptido señal de la bacteria productora, aumenta la producción de la bacteriocina por encima de la de un cultivo que contiene solamente la bacteria productora y su péptido señal.

**[0034]** Para los fines de la presente invención, el término “péptido” significa un compuesto de al menos dos o más aminoácidos o análogos de aminoácidos. Los aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden estar unidos por enlaces peptídicos. En otra realización, los aminoácidos pueden estar unidos por otros enlaces, p. ej., éster, éter, etc. Los péptidos pueden presentar cualquier configuración, como las configuraciones lineal, ramificada o cíclica. Según se usa en este documento, el término “aminoácidos” se refiere a aminoácidos naturales o sintéticos, incluidos los dos isómeros ópticos D y L y análogos de aminoácidos.

**[0035]** Los derivados y análogos peptídicos incluyen, pero no se limitan a aquellos que contienen, como secuencia aminoacídica primaria, toda o parte de la secuencia de aminoácidos del péptido, incluidas secuencias alteradas en las que restos aminoacídicos funcionalmente equivalentes sustituyen a restos dentro de la secuencia, con el resultado de una sustitución de aminoácidos conservadora.

**[0036]** Por ejemplo, uno o más restos aminoacídicos dentro de la secuencia pueden sustituirse por otro aminoácido de una polaridad similar, que actúa como equivalente funcional, lo que resulta en una alteración silenciosa. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos apolares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos que contienen estructuras de anillos aromáticos son fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se espera que tales alteraciones afecten significativamente al peso molecular aparente, según se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida, ni al punto isoeléctrico. Es posible también introducir sustituciones de aminoácidos no conservadoras para incluir un aminoácido con una propiedad particular preferible. Por ejemplo, puede introducirse Cys como un sitio potencial para la formación de puentes disulfuro con otro Cys. Pro puede introducirse a causa de su estructura particularmente plana.

**[0037]** Los péptidos pueden sintetizarse químicamente. Los péptidos sintéticos pueden prepararse mediante las técnicas bien conocidas de fase sólida o fase líquida, técnicas de condensación de péptidos o cualquier combinación de estas y pueden incluir aminoácidos naturales y/o sintéticos. Los aminoácidos usados para la síntesis de péptidos pueden ser la resina de aminoácidos Boc ( $N^{\alpha}$ -amino protegido con *t*-butiloxicarbonilo) estándar con los protocolos estándar de desprotección, neutralización, acoplamiento y lavado del procedimiento original de fase sólida de Merrifield (J. Am. Chem. Soc., volumen 85, 2154 – 1963) o el aminoácido sensible a bases con el  $N^{\alpha}$ -amino protegido con 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) (Carpino y Han, J. Org. Chem., volumen 37, 3403 – 3409, 1972). Además, el procedimiento descrito en este documento puede usarse con otros grupos protectores del grupo  $N^{\alpha}$  conocidos por los expertos en la técnica. La síntesis de péptidos en fase sólida puede llevarse a cabo mediante técnicas dentro del conocimiento normal de la técnica (véanse, por ejemplo, Stewart y Young, Solid Phase Synthesis, segunda edición, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., 1984; Fields y Noble, Int. J. Pept. Protein Res., volume 35, 161 – 214, 1990) o mediante el uso de sintetizadores automáticos.

**[0038]** Los ejemplos siguientes solamente pretenden ilustrar la invención más detalladamente y no tienen el objeto de limitar el alcance de la invención según se define por las reivindicaciones.

## EJEMPLO 1

**[0039]** Se sembraron células de las cepas *Enterococcus faecium* LWP-50-52, *Streptococcus cricetus* LWP-760 y *Lactobacillus salivarius* PVD-32 en frascos que contenían aproximadamente 300 ml de los medios siguientes: caldo de *Brucella*, caldo de *Brucella* al 10 % o M9 enriquecido con aminoácidos según indica la tabla 1 a continuación. Los frascos se incubaron en agitación a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 2, 4, 6 y 8 horas. La velocidad de agitación fue de aproximadamente 120 rpm. Se centrifugaron alícuotas del cultivo líquido a aproximadamente 6.000 x g durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente -4 °C. Los péptidos se aislaron por sedimentación de las proteínas con una disolución de  $(NH_4)_2SO_4$  aproximadamente al 40 % a aproximadamente 4 °C durante aproximadamente 24 horas, seguida de una filtración en gel mediante cromatografía de alta resolución con Superose 12 y selección de las fracciones de bajo peso molecular. Estas fracciones se cargaron en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba con octil-Sepharose 6B de flujo rápido y las proteínas se eluyeron con un gradiente de  $K_2HPO_4$  aproximadamente 0,4-0,9 M en tampón Tris 0,1 M, pH 5,1. Los resultados se presentan a continuación en la tabla 1. Según se observa en la tabla 1, los péptidos aislados de las

cepas productoras PVD-32, LWP- 50-52 y LWP- 760 son de bajo peso molecular y se acumulan fundamentalmente en los cultivos con medio mínimo (M9 más los aminoácidos indicados).

Tabla 1. Aislamiento y purificación de péptidos inductores de las cepas PVD-32, LWP-50-52 a LWP-760

Cultivo	Tiempo de cultivo (horas)			
	2	4	6	8
PVD-32				
Caldo de <i>Brucella</i>	0	0	0	0
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 %	0	0	péptido, p.m. 2,5 kDa 0,4 mg/ml volumen = 1 ml	0
M9 + fenilalanina al 0,03 % triptófano al 0,07 %	0	péptido, p.m. 2,5 kDa 0,2 mg/ml volumen = 1 ml	péptido, p.m. 2,5 kDa 0,9 mg/ml volumen = 1 ml	0
LWP-50-52				
Caldo de <i>Brucella</i>	0	0	0	0
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 %	0	péptido, p.m. 3,1 kDa 0,5 mg/ml volumen = 1 ml	0	0
M9 + triptófano al 0,05 %	0	0	péptido, p.m. 3,1 kDa 1,3 mg/ml volumen = 1 ml	péptido, p.m. 3,1 kDa 0,1 mg/ml volumen = 1 ml
LWP-760				
Caldo de <i>Brucella</i>	0	0	0	0
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 %	0	0	péptido, p.m. 2,1 kDa 2,1 mg/ml volumen = 1 ml	0
M9 + alanina al 0,02 % fenilalanina al 0,07 %	0	0	péptido, p.m. 2,1 kDa 2,8 mg/ml volumen = 1 ml	0

**[0040]** El péptido señal aislado de PVD-32 mostró una débil actividad antagonista contra *C. jejuni* y *S. enteritidis*, según se determinó en un ensayo de zonas de inhibición. Su actividad fue de aproximadamente 200 UA/ml y su peso molecular de aproximadamente 2,5 kDa, según determinación por electroforesis SDS-PAGE. El punto isoelectrónico (pI) fue de aproximadamente 7,9 (figuras 1A y 1B).

**[0041]** El péptido señal aislado de LWP-50-52 no mostró ninguna actividad antagonista contra *C. jejuni* ni *S. enteritidis*, según se determinó en un ensayo de zonas de inhibición. Su peso molecular fue de aproximadamente 3,1 kDa, según determinación por electroforesis SDS-PAGE y el punto isoelectrónico (pI) de aproximadamente 8,1 (figuras 2A y 2B).

**[0042]** El péptido señal aislado de LWP-760 no mostró ninguna actividad antagonista contra *C. jejuni* ni *S. enteritidis*, según se determinó en un ensayo de zonas de inhibición. Su peso molecular fue de aproximadamente 2,1 kDa, según determinación por electroforesis SDS-PAGE y su punto isoelectrónico de aproximadamente 8,9 (figuras 3A y 3B).

## EJEMPLO 2

**[0043]** Para determinar la eficacia del péptido señal aislado de las células de PVD-32 en la producción de la bacteriocina OR-7, se cultivaron células de PVD-32 en frascos con aproximadamente 300 ml de caldo de *Brucella* aproximadamente al 10 %. Al caldo se le añadió aproximadamente 1 ml de una suspensión de células de PVD-32 que contenía aproximadamente  $10^9$  UFC/ml y también se le añadieron aproximadamente 1 ml de una suspensión de células de la cepa inductora LWP-252 que contenía aproximadamente  $10^9$  UFC/ml y aproximadamente 0,10 mg/ml, 0,01 mg/ml o 0,001 mg/ml del péptido señal de PVD-32. Una muestra de control no contenía el péptido señal. Algunas muestras contenían las diferentes concentraciones del péptido señal y la cepa productora, sin la cepa inductora. Dos muestras contenían 0,1 mg/ml del péptido señal de LWP-760 o 0,1 mg/ml del péptido señal de LWP-

50-52 junto con las dos cepas, inductora y productora. Los frascos se incubaron a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 14 horas con una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm. Los resultados se resumen a continuación en la tabla 2.

5 **[0044]** Al finalizar las 14 horas, el sobrenadante de los cultivos se puso en frascos de centrífuga de 500 ml con aproximadamente 1 ml de Sepharose SP de flujo rápido regenerada (v/v 500:1). Estos se incubaron en agitación durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente. Después la suspensión se lavó con aproximadamente 100 ml de un tampón Tris-HCl 0,2 M, pH de aproximadamente 6,4. Las bacteriocinas se eluyeron por centrifugación con aproximadamente 100 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> aproximadamente 0,2 M, pH de aproximadamente 5,8, a 10 aproximadamente 7.000 x g durante aproximadamente 10 minutos. La actividad antagonista de las fracciones de bacteriocina contra *C. jejuni* y *S. enteritidis* se evaluó mediante un ensayo de zonas de inhibición, según se ha descrito anteriormente. El nivel de pureza de las fracciones de bacteriocina se determinó por SDS-PAGE. Los puntos isoelectrónicos de las fracciones se determinaron por isoelectroenfoque. Las concentraciones de proteína para todas las fracciones de bacteriocina se determinaron a 215 nm mediante un espectrofotómetro. Los resultados se 15 presentan a continuación en la tabla 2.

**[0045]** Según se observa en la tabla 2, el cultivo de PVD-32 (cepa productora) junto con LWP-252 (cepa inductora) en presencia de aproximadamente 0,01 mg del péptido señal purificado de PVD-32 aumenta el rendimiento de la bacteriocina OR-7 hasta aproximadamente 214,5 mg a partir de un litro de cultivo líquido. La 20 adición de los péptidos señal aislados de las cepas LWP-50-52 y LWP-760 no aumenta el rendimiento de la bacteriocina OR-7 respecto al control. Esto sugiere que el péptido señal es muy específico para con la cepa productora. La síntesis de la bacteriocina aumenta cuando el péptido señal, la cepa productora y la cepa inductora se introducen simultáneamente en el cultivo líquido.

25 **[0046]** Para evaluar el efecto del péptido señal en la producción de bacteriocinas en el cultivo a gran escala, las cepas productoras e inductoras se cultivaron en un biorreactor con aproximadamente 6 l de cultivo líquido. La relación de concentraciones de los cultivos y el péptido señal fue de 10<sup>9</sup> UFC/ml de PVD-32 (cepa productora), 10<sup>9</sup> UFC/ml de LWP-252 (cepa inductora) y 0,01 mg/ml del péptido señal purificado de PVD-32. La bacteriocina OR-7 se aisló después de aproximadamente 8, 10, 12 y 14 horas de cultivo. Véase la tabla 3. El esquema de la purificación es según se describe anteriormente. Los experimentos se repitieron tres veces. 30

Tabla 2. Influencia del péptido señal aislado de PVD-32 sobre la producción de la bacteriocina OR-7.

Condiciones experimentales	Volumen de la fracción, ml	Concentración de proteína mg/ml	Actividad UA/ml	Actividad específica UA/mg	mg de proteína/l	Aumento de proteína respecto al control
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % PVD-32 LWP-252 control	100	0,2	409.600	2.048.000	66	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % PVD-32, péptido señal de PVD-32 – 0,1 mg	100	0,18	102.400	568.888	59,4	0,9
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % PVD-32, péptido señal de PVD-32 – 0,01 mg	100	0,2	204.800	1.024.000	66	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % PVD-32, péptido señal de PVD-32 –	100	0,2	204.800	1.024.000	66	1

0,001 mg Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % PVD-32, LWP-252, péptido señal de PVD-32 – 0,1 mg	100	0,22	409.600	1.861.818	72,6	1,1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % PVD-32, LWP-252, péptido señal de PVD-32 – 0,01 mg	100	0,65	1.638.400	2.520.615	214,5	3,25
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % PVD-32, LWP-252, péptido señal de PVD-32 – 0,001 mg	100	0,22	409.600	1.861.818	72,6	1,1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % PVD-32, LWP-252, péptido señal de LWP-50-52 – 0,1 mg	100	0,17	51.200	301.176	56,1	0,85
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % PVD-32, LWP-252, péptido señal de LWP-760 – 0,1 mg	100	0,19	102.400	538.947	62,7	0,95

Tabla 3. Cultivo de la cepa productora PVD-32 y la cepa inductora LWP-252 en presencia del péptido señal de PVD-32 en condiciones a gran escala.

Condiciones experimentales	Volumen de la fracción, ml	Concentración de proteína mg/ml	Actividad UA/ml	Actividad específica UA/mg	Cantidad de proteína producida en 1 l en mg	Aumento de la cantidad de proteína respecto al control
Control	900	0,5	512.000	1.024.000	75	1
PVD-32, LWP-252, 0,2 mg de péptido señal de PVD-32	900	1,5	3.276.800	2.184.533	225	3

Control: biorreactor V-6 I, caldo de *Brucella* al 10 %, PVD-32, LWP-252, a pH 6,9, 37 °C, 150 rpm, 14 horas de cultivo. Péptido señal: reactor V-61, caldo de *Brucella* al 10 %, PVD-32, LWP-252, péptido señal de PVD-32 – 0,2 mg, pH 6,9, 37 °C, 150 rpm, 14 horas de cultivo.

5 El cultivo simultáneo de PVD-32 (cepa productora) y LWP-252 (cepa inductora) en presencia del péptido señal específico aislado de PVD-32 permite la producción de aproximadamente 214-215 mg de la bacteriocina OR-7 por litro de cultivo líquido.

**EJEMPLO 3**

**[0047]** Para determinar la eficacia del péptido señal aislado de LWP-50-52 en la producción de la bacteriocina 50-52, LWP-50-52 se cultivó a 37 °C según se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2. A un caldo de *Brucella* al 10 % se le añadió aproximadamente 1 ml de una suspensión de células de LWP-50-52 que contenía aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml, al caldo se le añadieron aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml de la cepa inductora LWP-320 y también aproximadamente 0,10 mg/ml, 0,01 mg/ml o 0,001 mg/ml del péptido señal de LWP-50-52. Una muestra de control no contenía el péptido señal. Algunas muestras contenían las diferentes concentraciones del péptido señal y la cepa productora, sin la cepa inductora. Dos muestras contenían 0,1 mg/ml del péptido señal de LWP-760 o 0,10 mg/ml del péptido señal de PVD-32 junto con las dos cepas, inductora y productora. Los frascos se incubaron a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 14 horas con una velocidad de agitación de aproximadamente 120 rpm. Los resultados se resumen a continuación en la tabla 4.

**[0048]** El aislamiento de la bacteriocina 50-52 requirió dos etapas: (1) el aislamiento de la bacteriocina del sobrenadante del cultivo líquido y (2) el aislamiento de la bacteriocina del precipitado de células de las dos cepas, inductora y productora. En la etapa 1, los cultivos se recolectaron y separaron por centrifugación a aproximadamente 10.000 x g durante aproximadamente 15 minutos para precipitar las células. El sobrenadante se cargó en una columna de octil-Sepharose 4 de flujo rápido para recuperar la bacteriocina mediante un tampón de elución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> aproximadamente 20 mM, pH de aproximadamente 7,0. El precipitado de células de la etapa 2 se suspendió en tampón de fosfato con NaCl aproximadamente al 0,7 %, pH de aproximadamente 5,6 (tampón de elución) y la suspensión se mezcló y se incubó durante aproximadamente 20 minutos. Después de la incubación, la suspensión se centrifugó a aproximadamente 10.000 x g durante aproximadamente 15 minutos. La bacteriocina se aisló del sobrenadante mediante cromatografía de intercambio iónico en Superose SP de flujo rápido con un tampón de elución que contenía Tris HCl aproximadamente 10 mM y NaCl aproximadamente 125 mM, pH de aproximadamente 7,5. Las actividades antagonistas de las fracciones de bacteriocina se evaluaron en un ensayo de zonas de inhibición. El nivel de pureza de las bacteriocinas se determinó por SDS-PAGE. Los puntos isoeléctricos de las fracciones se determinaron mediante isoelectroenfoque. Las concentraciones de proteína para todas las fracciones de bacteriocina se determinaron a aproximadamente 215 nm mediante un procedimiento espectrofotométrico.

Tabla 4. Influencia del péptido señal aislado de LWP-50-52 en la producción de la bacteriocina 50-52.

Condiciones experimentales	Volumen de la fracción, ml	Concentración de proteína mg/ml	Actividad UA/ml	Actividad específica UA/mg	mg de proteína/l	Aumento de proteína respecto al control
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, LWP-320 (control)	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,1 mg/ml	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,1 mg/ml añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	0,27	819.200	3.034.074	89,1	1,08
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 %	100	0,27	819.200	3.034.074	89,1	1,08

LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,10 mg/ml añadido después de aprox. 4 horas de cultivo						
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,10 mg/ml añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,26	919.200	3.150.769	85,8	1,04
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,01 mg/ml	100	0,27	819.200	3.034.074	89,1	1,08
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,01 mg/ml añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	0,31	819.200	2.642.580	102,3	1,24
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,01 mg/ml añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	0,27	819.200	3.034.074	89,1	1,08
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,01 mg/ml añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,27	819.200	3.034.074	89,1	1,08
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52,	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1

ES 2 382 466 T3

péptido señal de LWP-50-52: 0,001 mg/ml						
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,001 mg/ml añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,001 mg/ml añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-50-52: 0,001 mg/ml añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,1 mg/ml	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,1 mg/ml añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,1 mg/ml añadido después de	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1

ES 2 382 466 T3

aprox. 4 horas de cultivo						
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,1 mg/ml añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,01 mg/ml	100	1,0	1.638.400	1.638.400	330,0	4
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,01 mg/ml añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	1,07	3.276.800	3.062.429	353,1	4,28
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,01 mg/ml añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	1,0	1.638.400	1.638.400	330,0	4
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,01 mg/ml añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	1,0	1.638.400	1.638.400	330,0	4
Caldo de <i>Brucella</i> al 0 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,00 mg/ml	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52,	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1

péptido señal de LWP-320: 0,001 mg/ml añadido después de aprox. 2 horas de cultivo						
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,001 mg/ml añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, péptido señal de LWP-320: 0,001 mg/ml añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, LWP-320, péptido señal de LWP-760: adición de 0,1 mg/ml	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1
Caldo de <i>Brucella</i> al 10 % LWP-50-52, LWP-320, péptido señal de PVD-32: adición de 0,1 mg/ml	100	0,25	819.200	3.276.800	82,5	1

Según se observa en la tabla 4, el cultivo simultáneo de LWP-50-52 (cepa productora) y LWP-320 (cepa inductora) en presencia de aproximadamente 0,01 mg/ml del péptido señal de LWP-50-52 durante aproximadamente 8 horas aumenta el rendimiento de la bacteriocina 50-52 hasta aproximadamente 353,1 mg a partir de un litro de cultivo líquido. La adición de los péptidos señal aislados de PVD-32 y LWP-760 no aumentó el rendimiento de la bacteriocina 50-52 respecto al control. Debe señalarse que la síntesis de la bacteriocina aumenta máximamente si el péptido señal se introduce en el cultivo líquido aproximadamente 2 horas después del inicio del cultivo, con un tiempo de cultivo total de aproximadamente 12 horas.

- 5
- 10 **[0049]** Para evaluar la influencia del péptido señal sobre la producción de bacteriocinas en el cultivo a gran escala, las cepas productora e inductora se cultivaron en un biorreactor de 6 l de volumen que contenía aproximadamente 6 l de medio de cultivo. La relación de concentraciones de los cultivos y el péptido señal se mantuvo como en la tabla 5 para las condiciones de caldo de *Brucella* al 10 %, LWP-50-52, LWP-320, 0,01 mg/ml del péptido señal de LWP-50-52, añadido después de aproximadamente 2 horas de cultivo. El aislamiento de la bacteriocina 50-52 se realizó después de aproximadamente 8, 10, 12 y 14 horas de cultivo según se ha descrito
- 15 anteriormente. El control contenía caldo de *Brucella* al 10 %, LWP-50-52, LWP-320 a un pH de aproximadamente

6,9, a aproximadamente 37 °C y aproximadamente 150 rpm. La bacteriocina 50-52 se aisló después de aproximadamente 12 horas de cultivo. Para la segunda condición, las condiciones fueron las mismas, con la excepción de que se añadieron aproximadamente 0,22 mg del péptido señal de LWP-50-52 después de 2 horas de cultivo. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 5. Cada condición se repitió tres veces.

5

Tabla 5. Cultivo de la cepa productora LWP-50-52 y la cepa inductora LWP-320 en presencia del péptido señal de LWP-50-52.

Condiciones experimentales	Volumen de la fracción, ml	Concentración de proteína mg/ml	Actividad UA/ml	Actividad específica UA/mg	Cantidad de proteína/l de medio en mg	Aumento de la cantidad de proteína respecto al control
Control	900	0,6	1.638.400	2.730.667	90	1
Adición de 0,22 mg del péptido señal de LWP-50-52 después de 2 horas de cultivo	900	2,4	6.553.600	2.730.665	360	4

10 El cultivo de LWP-50-52 junto con LWP-320 en presencia del péptido señal de LWP-50-52 introducido aproximadamente 2 horas después del inicio del cultivo resulta en la producción de aproximadamente 360 mg/l de la bacteriocina 50-52 después de aproximadamente 12 horas de cultivo.

#### EJEMPLO 4

15

**[0050]** Para determinar la eficacia del péptido señal aislado de LWP-760 para la producción de la bacteriocina 760, se cultivó LWP-760 a aproximadamente 37 °C según se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2. A un caldo de *Brucella* aproximadamente al 10 % se le añadió aproximadamente 1 ml de una suspensión de células de LWP-760 que contenía aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml y en el momento del cultivo o aproximadamente 2, 4 ó 6 horas después del inicio del cultivo se añadió aproximadamente 1 ml de una preparación del péptido señal de LWP-760 de 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml o 0,001 mg/ml. Para otro conjunto de variables, a un caldo de *Brucella* aproximadamente al 10 % se le añadió aproximadamente 1 ml de una suspensión de células de LWP-760 que contenía aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml, al caldo se le añadió aproximadamente 1 ml de una suspensión de la cepa inductora LWP-320 que contenía aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml y en el momento del cultivo o aproximadamente 2, 4 ó 6 horas después del inicio del cultivo se añadió aproximadamente 1 ml de una preparación del péptido señal de LWP-760 de 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml o 0,001 mg/ml. El siguiente conjunto de condiciones incluyeron la adición de aproximadamente 1 ml de una suspensión de células de LWP-760 que contenía aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml a un caldo de *Brucella* aproximadamente al 10 %, la adición al caldo de aproximadamente 1 ml de una suspensión de células de la cepa inductora LWP-320 que contenía aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml y la adición de aproximadamente 1 ml de una preparación del péptido señal purificado de LWP-50-52 o el péptido señal purificado de PVD-32 de 0,1 mg/ml al inicio del cultivo. El control contenía aproximadamente 1 ml de una suspensión de células de LWP-760 que contenía aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml y aproximadamente 1 ml de una suspensión de células de la cepa inductora LWP-320 que contenía aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml en caldo de *Brucella* al 10 %.

35 **[0051]** La bacteriocina 760 se aisló mediante centrifugación para separar las células y el cultivo líquido a aproximadamente 10.000 x g durante aproximadamente 15 minutos. El sobrenadante se cargó en una columna de octil-Sepharose 4 de flujo rápido para recuperar la bacteriocina que se eluyó con un tampón de elución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15 mM a un pH de aproximadamente 6,3. El sedimento de células se suspendió en un tampón de fosfato que contenía NaCl aproximadamente al 0,7 %, pH de aproximadamente 5,6 (tampón de elución) y la suspensión se mezcló e incubó durante aproximadamente 20 minutos. Después del periodo de incubación, la suspensión se centrifugó a aproximadamente 10.000 x g durante aproximadamente 15 minutos. El sobrenadante se cargó en una columna de Superose SP de flujo rápido para aislar la bacteriocina mediante un tampón de elución que contenía Tris HCl aproximadamente 25 mM y NaCl aproximadamente 90 mM a un pH de aproximadamente 6,4. Las actividades antagonistas de las fracciones de bacteriocina contra *C. jejuni* y *S. enteritidis* se evaluaron en un ensayo de zonas de inhibición según se ha descrito anteriormente. El nivel de pureza de la bacteriocina 760 se determinó por SDS-PAGE. El punto isoeléctrico se determinó por isoelectroenfoque. Las concentraciones de proteína se determinaron a aproximadamente 215 nm mediante un procedimiento espectrofotométrico. Los resultados se presentan a continuación en la tabla 6.

45

Tabla 6. Influencia del péptido señal de LWP-760 en la producción de la bacteriocina 760.

Condiciones experimentales	Volumen de la fracción, ml	Concentración de proteína mg/ml	Actividad UA/ml	Actividad específica UA/mg	Proteína producida a partir de 1 l de cultivo líquido en mg	Aumento de la cantidad de proteína respecto al control
Control LWP-760, LWP-320	100	0,3	1.638.840	5.462.666	99	1
LWP-760 + 0,1 mg del péptido señal de LWP-760	100	0,31	1.638.840	5.286.580	102,3	1,03
LWP-760 + 0,1 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	0,31	1.638.840	5.286.580	102,3	1,03
LWP-760 + 0,1 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	0,31	1.638.840	5.286.580	102,3	1,03
LWP-760 + 0,1 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,31	1.638.840	5.286.580	102,3	1,03
LWP-760 + 0,01 mg del péptido señal de LWP-760	100	0,3	1.638.840	5.462.666	99	1
LWP-760 + 0,01 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	0,30	1.638.840	5.462.666	99	1
LWP-760 + 0,01 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	0,30	1.638.840	5.462.666	99	1
LWP-760 + 0,01 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,30	1.638.840	5.462.666	99	1
LWP-760 + 0,001 mg del péptido señal de LWP-760	100	0,30	1.638.840	5.462.666	99	1

ES 2 382 466 T3

LWP-760 + 0,001 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	0,30	1.638.840	5.462.666	99	1
LWP-760 + 0,001 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	0,30	1.638.840	5.462.666	99	1
LWP-760 + 0,001 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,30	1.638.840	5.462.666	99	1
LWP-760 + LWP-320 + 0,1 mg del péptido señal de LWP- 760	100	0,28	1.638.840	5.853.000	92,4	0,9
LWP-760 + LWP-320 + 0,1 mg del péptido señal de LWP- 760 añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	0,35	1.638.840	4.682.400	115,5	1,16
LWP-760 + LWP-320 + 0,1 mg del péptido señal de LWP- 760 añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	0,35	1.638.840	4.682.400	115,5	1,16
LWP-760 + LWP-320 + 0,1 mg del péptido señal de LWP- 760 añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,35	1.638.840	4.682.400	115,5	1,16
LWP-760 + LWP-320 + 0,01 mg del péptido señal de LWP- 760	100	1,56	6.533.600	4.201.025	514,8	5,2
LWP-760 + LWP-320 + 0,01 mg del péptido señal de LWP- 760 añadido	100	1,56	6.553.600	4.201.025	514,8	5,2

ES 2 382 466 T3

después de aprox. 2 horas de cultivo						
LWP-760 + LWP-320 + 0,01 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	2,1	13.107.200	6.241.523	693	7
LWP-760 + LWP-320 + 0,01 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	1,56	6.553.600	4.201.025	514,8	5,2
LWP-760 + LWP-320 + 0,001 mg del péptido señal de LWP-760	100	0,32	1.638.840	5.121.375	105,6	1,06
LWP-760 + LWP-320 + 0,001 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 2 horas de cultivo	100	0,32	1.638.840	5.121.375	105,6	1,06
LWP-760 + LWP-320 + 0,001 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 4 horas de cultivo	100	0,32	1.638.840	5.121.375	105,6	1,06
LWP-760 + LWP-320 + 0,001 mg del péptido señal de LWP-760 añadido después de aprox. 6 horas de cultivo	100	0,32	1.638.840	5.121.375	105,6	1,06
LWP-760 + LWP-320 + 0,1 mg del péptido señal de LWP-50-52	100	0,30	1.638.840	5.462.666	99	1
LWP-760 + LWP-320 + 0,1 mg del péptido señal de PVD-32	100	0,30	1.638.840	5.462.666	99	1

Según se observa en la tabla 6 anterior, el cultivo de la cepa inductora LWP-760 junto con la cepa inductora 320 y

aproximadamente 0,01 mg del péptido señal de LWP-760 después de 4 horas de cultivo aumenta el rendimiento de la bacteriocina 760 hasta aproximadamente 693 mg a partir de un litro de cultivo líquido. La introducción de los péptidos señal de PVD-32 y LWP-50-52 no aumentó el rendimiento de la producción de la bacteriocina 760 respecto al control.

5 **[0052]** Para evaluar el efecto del péptido señal en la producción de bacteriocinas en condiciones a gran escala, las cepas LWP-760 y LWP-320 se cultivaron en un biorreactor de 6 l de volumen con aproximadamente 6 l de caldo de *Brucella* al 10 %. La relación de concentraciones de los cultivos y el péptido señal se mantuvo como en la condición que produjo 510 mg/l de la bacteriocina 760 en la tabla 7 anterior. La bacteriocina se aisló después de aproximadamente 8, 10, 12 y 14 horas de cultivo. La máxima producción de bacteriocina tuvo lugar después de 12 horas de cultivo (tabla 7 a continuación).

15 Tabla 7. Cultivo de la cepa productora LWP-760 y la cepa inductora LWP-320 en presencia del péptido señal de LWP-760 en condiciones a gran escala.

Condiciones experimentales	Volumen de la fracción, ml	Concentración de proteína mg/ml	Actividad UA/ml	Actividad específica UA/mg	Proteína producida por 1 l de medio en mg	Aumento de la cantidad de proteína respecto al control
Control	900	0,8	3.276.800	4.096.000	120	1
0,22 mg del péptido señal de LWP-760	900	3,4	13.107.200	3.855.058	510	4,25

Control: biorreactor V-6 l, caldo de *Brucella* al 10 %, LWP-760, LWP-320, a pH 6,9, 37 °C, 150 rpm, 12 horas de cultivo. Péptido señal: reactor V-6 l, caldo de *Brucella* al 10 %, LWP-760, LWP-320, péptido señal de LWP-760 – 0,22 mg añadidos después de 2 horas de cultivo, pH 6,9, 37 °C, 150 rpm, 12 horas de cultivo.

#### EJEMPLO 5

20 **[0053]** Las secuencias de aminoácidos de los péptidos señal se determinaron mediante la degradación de Edman con un secuenciador automático 491 cLC (Applied Biosystems, La Jolla, California, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. La determinación de la masa molecular de cada péptido señal se realizó mediante desorción/ionización por láser asistida por matriz y espectrometría de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOFMS) con un espectrómetro de masas de ionización por electroespray (API IIIITAGA 6000E, CJEX, Bombay, India) según las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la tabla 8 a continuación.

25 Tabla 8. Secuencias de aminoácidos de las bacteriocinas OR-7, LWP-50-52 y LWP-760 y de sus correspondientes péptidos señal.

Muestra	Secuencia de aminoácidos	Masa molecular (Da) <sup>a</sup>
Bacteriocina OR-7	KTYOTNGVHCTKNSLWGWKVRLLKNMKYDQNTTYMGRLLQDILLGWATGAFKTH SEQ ID NO 2	5.123
Péptido señal de PVD-32	MVTKSLVLAWVVALLACGMVKGLT SEQ ID NO 3	2.347
Bacteriocina 50-52	TTKNYONOV CNSVNWQCQCONVWASCNLATOCAAWLCKLA SEQ ID NO 4	3.932
Péptido señal de LWP-50-52	TNVTKSWWVLAGCNQVVASNCNCONVKGLT SEQ ID NO 5	3.065
Bacteriocina 760	NRWYCNSAAOOVGOAA VCGLAGYVGLAGYVGEAKENIAGBVRKGGWGMAGGFTHNKACKSFPGS GWASG SEQ ID NO 6	5.362
Péptido señal de LWP-760	WNKYKTNWVLSVCNTGCACAAVKGLT SEQ ID NO 7	2.095

30 **[0054]** El propósito de la descripción detallada precedente es la ilustración. Tal detalle es solamente para este propósito y los expertos en la técnica pueden llevar a cabo variaciones según se definen en las reivindicaciones anejas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0055]

- 5 <110> Los Estados Unidos de América, representados por el Ministro de Agricultura
- <110> State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
- <120> Péptidos inductores de bacteriocinas
- <130> SMK/FP6560403
- <140> EP 06849028.3
- 10 <141> 08-12-2006
- <150> PCT/US2006/047088
- <151> 08-12-2006
- <150> US 11/297.841
- <151> 08-12-2005
- 15 <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 5
- <212> Proteína
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Una secuencia carboxiterminal de un péptido bacteriano
- <400> 1

Val Lys Gly Leu Thr  
1 5

- 25 <210> 2
- <211> 53
- <212> Proteína
- 30 <213> *Lactobacillus salivarius*
- <400> 2

Lys Thr Tyr Tyr Gly Thr Asn Gly Val His Cys Thr Lys Asn Ser Leu  
1 5 10 15

Trp Gly Lys Val Arg Leu Lys Asn Met Lys Tyr Asp Gln Asn Thr Thr  
20 25 30

Tyr Met Gly Arg Leu Gln Asp Ile Leu Leu Gly Trp Ala Thr Gly Ala  
35 40 45

Phe Gly Lys Thr His  
50

- 35 <210> 3
- <211> 24
- <212> Proteína
- <213> *Lactobacillus salivarius*
- <400> 3
- 40

Met Val Thr Lys Ser Leu Val Leu Ala Trp Val Val Ala Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Cys Gly Met Val Lys Gly Leu Thr  
20

5 <210> 4  
 <211> 39  
 <212> Proteína  
 <213> *Enterococcus faecium*  
 <400> 4

Thr Thr Lys Asn Tyr Gly Asn Gly Val Cys Asn Ser Val Asn Trp Cys  
 1 5 10 15  
 Gln Cys Gly Asn Val Trp Ala Ser Cys Asn Leu Ala Thr Gly Cys Ala  
 20 25 30  
 Ala Trp Leu Cys Lys Leu Ala  
 35

10 <210> 5  
 <211> 30  
 <212> Proteína  
 <213> *Enterococcus faecium*  
 <400> 5

Thr Asn Val Thr Lys Ser Trp Trp Val Leu Ala Gly Cys Asn Gln Val  
 1 5 10 15  
 Val Ala Ser Asn Cys Asn Cys Gly Asn Val Lys Gly Leu Thr  
 20 25 30

15 <210> 6  
 <211> 62  
 <212> Proteína  
 20 <213> *Streptococcus cricetus*  
 <400> 6

Asn Arg Trp Tyr Cys Asn Ser Ala Ala Gly Gly Val Gly Gly Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Val Cys Gly Leu Ala Gly Tyr Val Gly Glu Ala Lys Glu Asn Ile Ala  
 20 25 30  
 Gly Glu Val Arg Lys Gly Trp Gly Met Ala Gly Gly Phe Thr His Asn  
 35 40 45  
 Lys Ala Cys Lys Ser Phe Pro Gly Ser Gly Trp Ala Ser Gly  
 50 55 60

25 <210> 7  
 <211> 26  
 <212> Proteína  
 <213> *Streptococcus cricetus*  
 <400> 7

30

Trp Asn Lys Tyr Lys Thr Asn Trp Val Leu Ser Val Cys Asn Thr Gly  
1 5 10 15

Cys Ala Cys Ala Ala Val Lys Gly Leu Thr  
20 25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos carboxiterminal de SEQ ID NO 1, en que el péptido aumenta la producción de bacteriocinas cuando se añade a un cultivo de células productoras de bacteriocinas.
2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en que el péptido es un péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3.
- 10 3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en que el péptido es un péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 5.
4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1. en que el péptido es un péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 7.
- 15 5. Un procedimiento para aumentar la producción de una bacteriocina que comprende:
- (a) la adición de una bacteria productora de la bacteriocina junto con una bacteria inductora a un sistema de cultivo,  
 (b) la adición de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y  
 (c) el cultivo de dicha bacteria junto con dicho péptido durante un tiempo para alcanzar una producción aumentada de dicha bacteriocina.
- 20 6. Un procedimiento para estimular la producción de una bacteriocina con la secuencia de SEQ ID NO 2 que comprende:
- 25 (a) la adición de la línea de células productoras de la bacteriocina NRRL B-30514 junto con la línea de células inductoras NRRL 30884 a un sistema de cultivo,  
 (b) la adición de un péptido con la secuencia de SEQ ID NO 3 y  
 (c) el cultivo de dicha bacteria junto con dicho péptido durante un tiempo para alcanzar una producción aumentada de dicha bacteriocina.
- 30 7. Un procedimiento para estimular la producción de una bacteriocina con la secuencia de SEQ ID NO 4 que comprende:
- 35 (a) la adición de la línea de células productoras de la bacteriocina NRRL B-30746 y la línea de células inductoras NRRL B-30510 a un sistema de cultivo,  
 (b) la adición de un péptido con la secuencia de SEQ ID NO 5 a dicho sistema y  
 (c) el cultivo de dichos bacteria y péptido durante un tiempo para alcanzar una producción aumentada de dicha bacteriocina.
- 40 8. Un procedimiento para estimular la producción de una bacteriocina con la secuencia de SEQ ID NO 6 que comprende:
- 45 (a) la adición de la línea de células productoras de la bacteriocina NRRL B-30745 junto con la línea de células inductoras NRRL B-30510 a un sistema de cultivo,  
 (b) la adición de un péptido con la secuencia de SEQ ID NO 7 y  
 (c) el cultivo de dicha bacteria junto con dicho péptido durante un tiempo para alcanzar una producción aumentada de dicha bacteriocina.
- 50 9. Un procedimiento para estimular la producción de una bacteriocina con la secuencia de SEQ ID NO 2 que comprende:
- 55 (a) la adición de la línea de células productoras de la bacteriocina NRRL B-30514 junto con la línea de células inductoras NRRL 30884 a un sistema de cultivo,  
 (b) la adición de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y  
 (c) el cultivo de dicha bacteria junto con dicho péptido durante un tiempo para alcanzar una producción aumentada de dicha bacteriocina.
- 60 10. Un procedimiento para estimular la producción de una bacteriocina con la secuencia de SEQ ID NO 4 que comprende:
- (a) la adición de la línea de células productoras de la bacteriocina NRRL B-30746 y la línea de células inductoras NRRL B-30510 a un sistema de cultivo,  
 (b) la adición de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 a dicho sistema y  
 (c) el cultivo de dichos bacteria y péptido durante un tiempo para alcanzar una producción aumentada de dicha

bacteriocina.

11. Un procedimiento para estimular la producción de una bacteriocina con la secuencia de SEQ ID NO 6 que comprende:

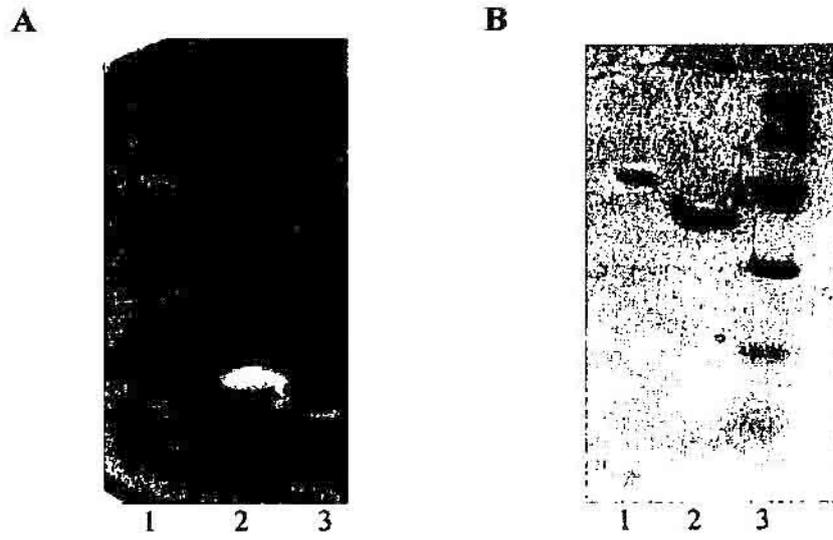
- 5
- (a) la adición de la línea de células productoras de la bacteriocina NRRL B-30745 junto con la línea de células inductoras NRRL B-30510 a un sistema de cultivo,
  - (b) la adición de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y
  - (c) el cultivo de dicha bacteria junto con dicho péptido durante un tiempo para alcanzar una producción aumentada de dicha bacteriocina.
- 10

12. La cepa aislada de *Enterococcus faecium* NRRL B-30746.

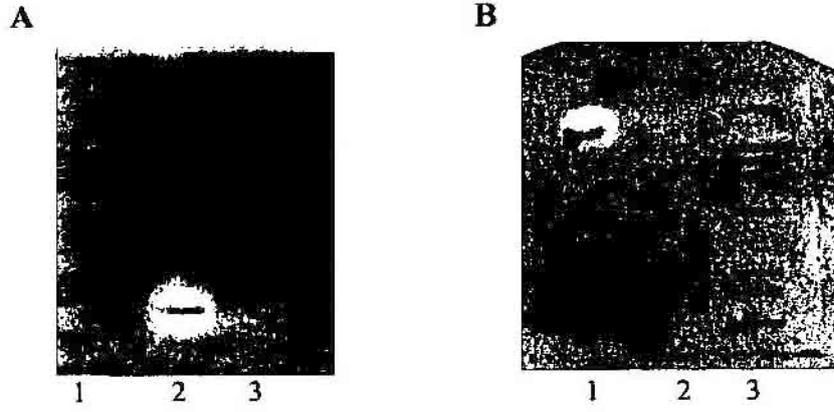
13. La cepa bacteriana aislada NRRL B-30745.

15

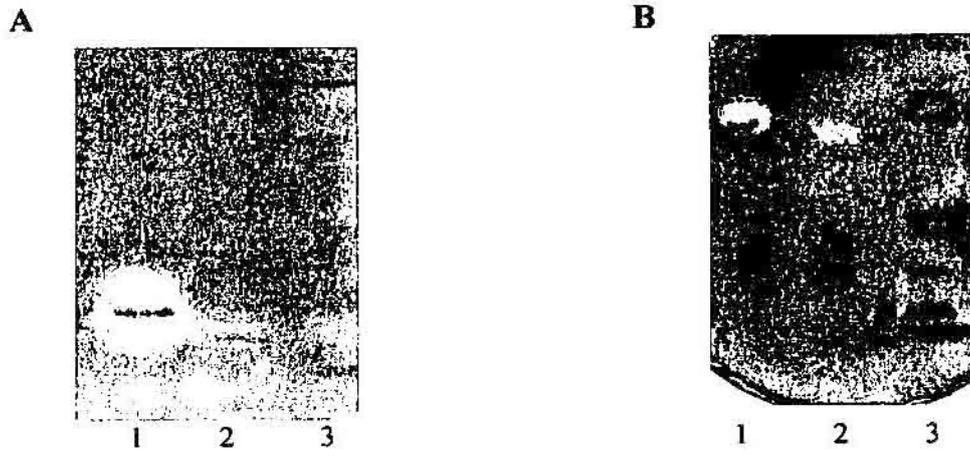
14. Una bacteriocina aislada producida por una cepa seleccionada del grupo que consta de NRRL B-30746 y NRRL B-30745, en que la bacteriocina tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 4 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 6.



**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**